

Aus dem Bereich Anatomie und Zellbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes Homburg/Saar

**Die Rolle von Carboanhydrasen und Natrium/Bikarbonat-
Ko-Transportern bei der Bikarbonat-induzierten frühen
Aktivierung muriner Spermien**

DISSERTATION zur Erlangung eines naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

vorgelegt von Michael Raubuch

geb. am 25.07.1980 in Saarbrücken

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität des Saarlandes am

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael Menger

Referent: Univ.-Prof. Dr. Gunther Wennemuth

1. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Markus Hoth

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	7
1.1 INFERTILITÄT	7
1.2 SPERMATOGENESE UND AUFBAU DER SPERMIENZELLE	9
1.3 FRÜHE AKTIVIERUNG VON SPERMEN UND DIE KAPAZITATION IM WEIBLICHEN GENITALTRAKT	13
1.4 CARBOANHYDRASEN	17
1.5 NATRIUM/BIKARBONAT-KO-TRANSPORTER 1 (NBC1)	20
1.6 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 MATERIAL	23
2.1.1 Geräte	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3 Chemikalien	25
2.1.4 Standardlösungen	28
2.1.5 Primer	34
2.1.6 Software	35
2.2 METHODEN	36
2.2.1 Gewebeentnahme und Gewebeverdau	36
2.2.2 Genotypisierung	36
2.2.3 Spermienpräparation	43
2.2.4 Computergestützte Spermien Analyse (CASA)	44
2.2.5 Analyse der Schlagfrequenz von Spermien	46
2.2.6 Messung des intrazellulären pH-Werts	49
2.2.7 Applikation von CO ₂	53
2.2.8 Nachweis der enzymatischen Carboanhydraseaktivität	56
2.2.9 Spermienausstriche	57
2.2.10 Immunzytologie	58
2.2.11 Proteinextraktion	61
2.2.12 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	61
2.2.13 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	62
2.2.14 Western-Blot	65

2.2.15 Proteinfärbung mit Ponceau-S	66
2.2.16 Antikörperdetektion	67
2.2.17 Statistik	68
3 ERGEBNISSE	69
3.1 SOWOHL HCO_3^- ALS AUCH CO_2 FÜHREN ZUR ERHÖHUNG DER SCHLAGFREQUENZ VON SPERMEN	69
3.2 GESAMTAKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON CARBOANHYDRASEN IN SPERMEN UND DEREN ROLLE BEI DER MODULATION DER CO_2 -BEDINGTEN INTRAZELLULÄREN ANSÄUERUNG	74
3.3 SPERMEN AUS UNTERSCHIEDLICHEN NEBENHODENABSCHNITTEN REAGIEREN UNTERSCHIEDLICH AUF HCO_3^-	80
3.4 DIE COMPUTERGESTÜTZTE SPERMEN ANALYSE ZEIGT UNTERSCHIEDE IN DER MOTILITÄT VON $\text{CA IV}^{-/-}$ SPERMEN	82
3.5 IN $\text{CA IV}^{-/-}$ SPERMEN IST SOWOHL DIE GESAMTCARBOANHYDRASEAKTIVITÄT, ALS AUCH DIE CO_2 -INDUZIERTER BESCHLEUNIGUNG DER SCHLAGFREQUENZ REDUZIERT	84
3.6 $\text{CA IV}^{-/-}$ SPERMEN, SOWIE $\text{CA XIV}^{-/-}$ SPERMEN ZEIGEN UNTERSCHIEDE IN DER CO_2 -INDUZIERTEN INTRAZELLULÄREN ANSÄUERUNG	91
3.7 CBIMPS, EIN CAMP-ANALOGON, BESCHLEUNIGT DIE SCHLAGFREQUENZ VON SPERMEN UNABHÄNGIG VON CARBOANHYDRASEN.....	93
3.8 HCO_3^- REDUZIERT DIE CO_2 -INDUZIERTER INTRAZELLULÄRE ANSÄUERUNG VON SPERMEN	98
3.9 NACHWEIS DES Natrium/Bikarbonat-Ko-Transporters NBC1 IN MURINEN SPERMEN	100
3.10 DER ANIONENTRANSPORT-INHIBITOR DIDS BEEINFLUSST SOWOHL DIE HCO_3^- -INDUZIERTER ERHÖHUNG DER SCHLAGFREQUENZ, ALS AUCH DIE INTRAZELLULÄRE ALKALINISIERUNG VON SPERMEN	103
3.11 Natrium BEEINFLUSST DEN HCO_3^- -INDUZIERTEN ANSTIEG DES INTRAZELLULÄREN PH-WERTS VON SPERMEN.....	106
4 DISKUSSION.....	109
5 ZUSAMMENFASSUNG	128
6 LITERATURVERZEICHNIS	130
7 PUBLIKATIONEN/DANKSAGUNG	139

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
BCA	bicinchoninic acid
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxyethyl))-5-(und-6)- carboxyfluorescein
CA	Carboanhydrase
Ca ²⁺	Kalziumion
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
CatSper	spermienassoziierter Kationenkanal
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cGMP	zyklisches Guanosin-5'-Monophosphat
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GPI Anker	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol Anker
HS	High Saline
HSB	High Saline + Bikarbonat
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2- ethansulfonsäure)

Kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KO	knock out
mA	Milliampere
mRNA	messenger RNA
NBC	Natrium/Bicarbonat Cotransporter
NEB	New England Biolabs
NHE	Natrium/Hydrogen Exchanger
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-chain-reaction
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline + Tween 20
V	Volt
x g	x Erdbeschleunigung

1 Einleitung

1.1 Infertilität

Aufgrund von Infertilität bleibt bei 15% aller Paare der Wunsch nach Kindern unerfüllt (*Martin 2008*), wobei die Ursachen sowohl bei der Frau als auch beim Mann bzw. bei beiden Partnern zu finden sein können. Dass die Infertilität oft von Laien mit Impotenz gleichgesetzt wird, ist mitunter ein Grund dafür, dass bei männlichen Patienten die Diagnose der Infertilität zudem physische (Hormonstörungen), psychische (Versagensängste) sowie soziale Konsequenzen (Rückzug aus dem gesellschaftlichen Umfeld) nach sich zieht. Männliche Infertilität kann sowohl auf posttestikuläre Ursachen (bilaterale Aplasie des Ductus deferens) als auch auf testikuläre Ursachen wie chromosomale und genetische Defekte (Klinefelter Syndrom) zurückgeführt werden. Zudem können Toxine und Medikamente (Strahlentherapie), Hormonstörungen (Östrogenüberschuss), bakterielle bzw. virale Infektionen (Mumps) sowie Spermienfunktionsstörungen (Immotilität) zu Infertilität führen. Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) (*Martin 2008*) gilt als eine von vielen Behandlungsmöglichkeiten männlicher Infertilität. Hierbei wird die Eizelle, unter Umgehung des natürlichen Selektionsverfahrens, mit einem manuell gewählten Spermatozoon befruchtet, wobei die Folgen und Risiken solcher moderner reproduktionsmedizinischen Maßnahmen noch weitgehend unklar sind. Dies ist mitunter ein Grund dafür, dass die Identifizierung der molekularen

Grundlagen aller Teile des Befruchtungsvorgangs, welcher auch die Spermatogenese, Spermienreifung und Kapazitation beinhaltet, von großer Bedeutung ist. Obwohl bereits bekannt ist, dass Bikarbonat sowohl bei der Reifung fertiler Spermien im Nebenhoden als auch bei der frühen Aktivierung von Spermien im Uterus als wichtiger Faktor fungiert (*Visconti, Bailey et al. 1995; Visconti, Stewart-Savage et al. 1999; Wennemuth, Babcock et al. 2003; Shum, Da Silva et al. 2009*) ist über die Regulation der Bikarbonatkonzentration im Nebenhoden sowie den Mechanismus der Bikarbonataufnahme von Spermienzellen wenig bekannt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Carboanhydrasen, welche aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität in vielen Geweben an der Säure-Base-Homöostase von Kohlendioxid und Bikarbonat beteiligt sind, in diese Prozesse involviert sind (*Au and Wong 1980; Ekstedt and Ridderstrale 1992; Asari, Sasaki et al. 1996; Jensen, Schmitt et al. 1999*). Da bei der Analyse von Microarray-Daten eine erhöhte Expression der Carboanhydrasen II, IV und XIV im Genitaltrakt der Maus beobachtet wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle dieser drei Carboanhydrasen bei der Bikarbonat-induzierten Aktivierung von Spermien untersucht werden. Desweiteren wurden Hinweise gesucht, über welchen Mechanismus Bikarbonat zur Induktion der Schlagfrequenzerhöhung die Plasmamembran der Spermienzelle passiert.

1.2 Spermatogenese und Aufbau der Spermienzelle

Die als Spermatogenese bezeichnete Bildung männlicher Keimzellen gliedert sich in zwei Phasen, die Spermatozytogenese und die Spermio-genese. Die Bildung von Spermatogonien aus Stammzellen findet sowohl bereits pränatal als auch während der Pubertät statt. Bei der Spermatozytogenese findet die klonale Vermehrung und Differenzierung von Spermatogonien statt, welche an der Basallamina der Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) lokalisiert sind. Genauer wird hierbei nach mitotischer Teilung der Spermatogonien A bei nur einer der Tochterzellen die Spermatogenese eingeleitet, welche als Spermatogonien B bezeichnet werden. Es folgt eine weitere mitotische Teilung der Spermatogonien B, woraus Spermatozyten I hervorgehen. Diese vollziehen nach Duplikation des DNA-Gehalts die erste meiotische Teilung (Reduktionsteilung), wobei in der Prophase, welche beim Menschen etwa 20 Tage andauert, die Rekombination des mütterlichen und väterlichen Erbguts stattfindet. Somit entstehen Spermatozyten II mit einem DNA-Gehalt von $2n$, welche in histologischen Schnitten des Hodens allerdings nur selten zu erkennen sind, da die folgende zweite Reduktionsteilung nur wenige Stunden beansprucht. Nach Entstehung der haploiden Spermatiden ist die Spermatozytogenese abgeschlossen. Die darauffolgenden Zytodifferenzierungen der Spermatiden werden als Spermio-genese zusammengefasst. Hierbei unterscheidet man vier verschiedene Phasen (Kernkondensation, Akrosomenbildung,

Zytoplasmareduktion und Spermatozoenschwanzentwicklung), welche allerdings teilweise gleichzeitig ablaufen. Während der Phase der Kernkondensation findet eine exzentrische Verlagerung des Zellkerns statt, wobei dieser durch Verdichtung des Chromatins auf etwa 10% seines ursprünglichen Volumens reduziert wird. Aus dem Golgi-Apparat bildet sich das Akrosom, welches sich kappenartig um den Zellkern anordnet und essentiell für die Penetration der Zona Pellucida ist. Außer der Reduktion von überschüssigem Zytoplasma, welches von phagozytotisch aktiven Sertoli-Zellen aufgenommen wird, kommt es zur Entwicklung des für die Fortbewegung des Spermiums benötigten Schwanzes aus den Zentriolen der Spermatide. Im Anschluss erfolgt die als Spermiation bezeichnete Freisetzung der Spermatozoen in das Lumen der Hodenkanälchen. Dort findet ein passiver Transport der Spermatozoen über das Rete Testis in den Nebenhoden (Epididymis) statt. Hierbei durchlaufen die Spermatozoen einen weiteren Reifungsprozess, welcher beim Menschen 8-17 Tage beansprucht. Der Nebenhoden gliedert sich in den Nebenhodenkopf (Caput), -körper (Corpus) und -schwanz (Cauda) und dient außer der Speicherung auch der weiteren Reifung sowie der Konzentrierung der Spermien. Der Prozess der Spermienkonzentrierung durch Resorption von Nebenhodenflüssigkeit findet größtenteils bereits im Nebenhodenkopf statt. Das Nebenhodenepithel der verschiedenen Nebenhodenabschnitte sezerniert zudem unterschiedliche Proteine und andere Faktoren, wodurch komplexe biochemische Modifikationen innerhalb des Spermiums ausgelöst werden, welche die

Reifung und Speicherung beeinflussen. Die Speicherung der aus der Spermatogenese entstandenen morphologisch ausdifferenzierten Spermatozoen bis zur Ejakulation findet im Nebenhoden statt. In Abbildung 1 ist der Aufbau eines humanen Spermiums schematisch dargestellt.

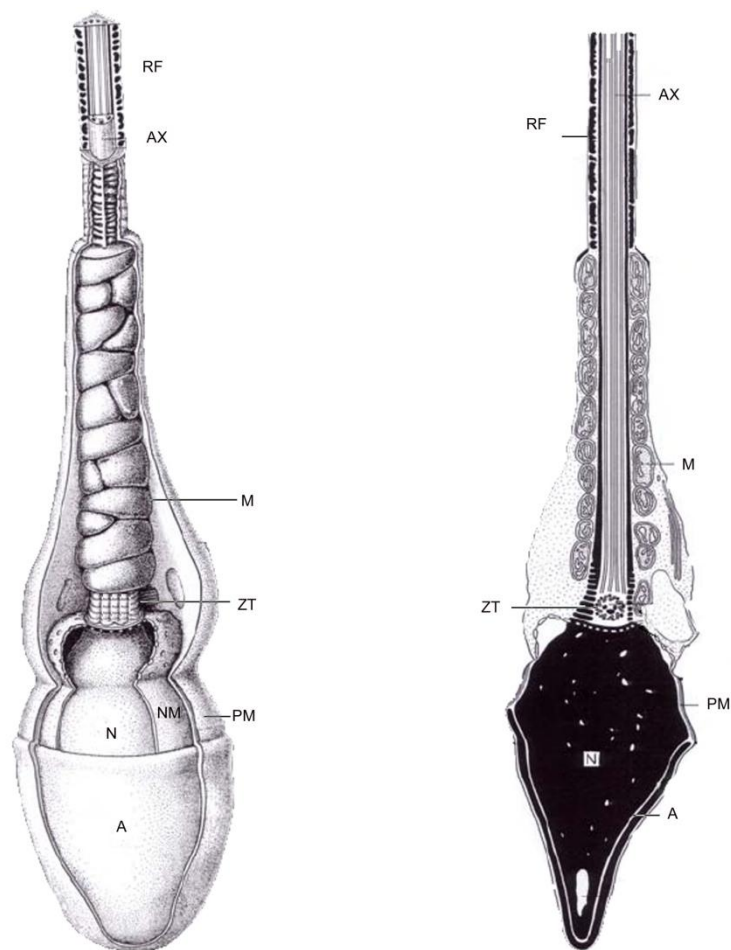


Abbildung 1: Graphische Darstellung eines humanen Spermatozoons (links), sowie die Zeichnung einer elektronenmikroskopischen Abbildung (rechts), A= Akrosom, AX= Axonema, M= Mitochondrium, N= Nukleus, NM= Nukleäre Membran, PM= Plasmamembran, RF= Ringfaser, ZT= Zentriol, das Schwanzstück ist nur partiell dargestellt (modifiziert nach Roosen-Runge, Atlas of Human Spermatogenesis, 1981).

Bei Spermien wird prinzipiell zunächst zwischen Kopf (Caput) und Schwanz unterschieden. Dem im Kopf befindlichen Zellkern mit dem kondensierten Chromatin liegt das Akrosom in Form einer kappenartigen Struktur auf, welches vom Golgi-Apparat der Spermatiden abstammt. Dieses enthält zahlreiche hydrolysierende Enzyme zur Fusion mit der Eizelle. Der Spermischwanz wird weiterhin in Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück untergliedert. Im Halsstück, welches als Verbindungsglied zwischen Kopf und Schwanz fungiert, befindet sich neben Zentriol und Basalkörper auch der Ursprung des als Axonema bezeichneten zentralen Achsenfadens, welcher den kompletten Schwanzteil des Spermiums durchzieht. Dieser besteht aus einer Mikrotubuli-Struktur, welche den typischen $9 \times 2 + 2$ Aufbau aufweist. Die zur Geißelbewegung benötigte Energie liefern zirkulär um das Axonema angeordnete Mitochondrien, welche im Mittelstück lokalisiert sind. Außerdem wird das Mittelstück vom Halsstück durch spiralig angeordnete Längsfasern abgegrenzt, welche im Bereich des Hauptstückes in Ringfasern übergehen. Etwa 5 μm vor dem Ende des Spermischwanzes enden die Ringfasern schließlich im Endstück (*Holstein, Schulze et al. 2003; Junqueira L. C. 2004*).

1.3 Frühe Aktivierung von Spermien und die Kapazitation im weiblichen Genitaltrakt

Trotz der Tatsache, dass ejakulierte Spermien bereits vollständig entwickelt sind, ist ein weiterer Reifungsprozess im weiblichen Genitaltrakt erforderlich, um die Befruchtung der Eizelle zu ermöglichen. Die bei diesem Prozess auftretenden intrazellulären Veränderungen sowie Modifikationen der Plasmamembran wurden bereits Anfang der 50er Jahre unabhängig von Chang und Austin postuliert. Seitdem wird dieser postepididymale Reifungsprozess als Kapazitation bezeichnet (*Austin 1951; Chang 1951*). Es ist bekannt, dass diese biochemischen und physiologischen Veränderungen essentiell für die Fusion des Spermatozoons mit der Plasmamembran der Eizelle sind, doch deren Signalwege und Komponenten sind noch nicht vollständig bekannt. Als essentielle Komponenten konnten bereits Bikarbonat, Kalzium und Albumin identifiziert werden (*Visconti, Bailey et al. 1995*). Aufgrund der erhöhten Bikarbonatkonzentration im Seminalplasma und in der Zervixflüssigkeit kommt es zu bikarbonatspezifischen Veränderungen der Spermatozoen (*Brooks 1983*). Hierbei wurde ein Anstieg des intrazellulären pH-Wertes, Veränderungen der Membranarchitektur sowie eine Hyperaktivierung des Spermischwanzes beobachtet (*Vredenburg-Wilberg and Parrish 1995; Flesch, Wijnand et al. 2001; Suarez and Ho 2003*). Genauer betrachtet führt der Import von Bikarbonat zur Aktivierung der spermien-spezifischen zytosolischen Adenylatzyklase (SACY) und somit zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration

(Okamura, Tajima et al. 1985; Chen, Cann et al. 2000; Sinclair, Wang et al. 2000). Zudem wurde gezeigt, dass ein Fehlen der SACY zur Infertilität des Betroffenen führt (Litvin, Kamenetsky et al. 2003; Esposito, Jaiswal et al. 2004; Carlson, Hille et al. 2007). Der erhöhte intrazelluläre cAMP-Gehalt führt über die Aktivierung der Proteinkinase A (Nolan, Babcock et al. 2004) zur Phosphorylierung verschiedener Zielproteine (Visconti, Stewart-Savage et al. 1999). Hierbei kann bereits nach 30 Sekunden die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten beobachtet werden, woraus eine Erhöhung der Schlagfrequenz des Flagellums resultiert (Harrison and Miller 2000; Wennemuth, Carlson et al. 2003; Harrison 2004). Diese, als frühe Aktivierung bezeichnete Frequenzerhöhung, ermöglicht es dem Spermium, den Uterus zu passieren und somit die Eizelle zu erreichen. Im Gegensatz dazu tritt die kapazitationsassoziierte Proteintyrosinphosphorylierung erst nach einer Stunde auf (Harrison, Carr et al. 2000; Harrison 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Bikarbonatimport, welcher die Kapazitation einleitet, durch Natrium/Bikarbonat-Ko-Transporter vermittelt wird (Demarco, Espinosa et al. 2003). Wie bei der frühen Aktivierung induziert Bikarbonat während der Kapazitation die Hyperaktivität des Spermischwanzes, welche das Spermium dazu befähigt, den Cumulus oophorus, welcher aus einer Schicht Granulosa-Zellen des Follikels besteht, zu durchdringen. Zudem löst Bikarbonat während der Kapazitation einen weiteren wichtigen Effekt aus, welchen man als Phospholipid-Scrambling bezeichnet (Gadella and Harrison 2000). Hierbei wird membranverankertes Cholesterol aus der

akrosomalen Region des Spermiums entfernt, wobei Albumin als Cholesterolakzeptor fungiert (*Flesch, Wijnand et al. 2001*). Das in der follikulären Flüssigkeit enthaltene Albumin führt somit zur Steigerung der Membranfluidität, was die Verschmelzung mit der Eizelle vereinfacht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Bikarbonat Kalziumkanäle in der Plasmamembran von Spermien aktiviert und somit einen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration bewirkt (*Wennemuth, Westenbroek et al. 2000; Wennemuth, Carlson et al. 2003*). Wie bereits erwähnt, stellt Kalzium eine weitere wichtige Komponente während der Kapazitation dar. Aufgrund seiner Wirkung als second messenger beeinflusst die Anwesenheit von Kalzium mehrere Signalwege. Es wurde gezeigt, dass bei der frühen Aktivierung von Spermien extrazelluläres Kalzium für die Bikarbonat-induzierte Aktivierung der SACY benötigt wird (*Carlson, Hille et al. 2007*). Außer durch Kalzium wird sowohl Motilität, Chemotaxis, Kapazitation als auch die Akrosomenreaktion in Spermien durch den Anstieg des intrazellulären pH reguliert. In humanen Spermien ist der spannungsgesteuerte Protonenkanal Hv1 für den Ausstrom von H^+ -Ionen verantwortlich wodurch ein Anstieg des intrazellulären pH-Wertes bewirkt wird (*Lishko and Kirichok 2010*). Dies führt zur Aktivierung der beiden spermien-spezifischen, pH-abhängigen Kationenkanäle CatSper 1 und CatSper 2, welche für den Einstrom von Kalzium verantwortlich sind. Hierbei wurde gezeigt, dass die Aktivität von CatSper 1 essentiell für die Hyperaktivierung der Schlagfrequenz während der Kapazitation ist (*Carlson,*

Westenbroek et al. 2003). Nachdem die Spermien den Cumulus oophorus passiert haben, folgt die akrosomale Reaktion, welche zum Verschmelzen von Spermium und Eizelle führt. Hierbei binden oberflächliche Glykoproteine der Zona pellucida an spezifische Rezeptoren in der Plasmamembran des Spermatozoons (*Tulsiani, Yoshida-Komiya et al. 1997*). Demzufolge wird im Spermium ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt, was über einen G-Protein-gekoppelten Signalweg (*Ward, Kopf et al. 1994*) die Aktivitätssteigerung der Phospholipase C induziert. Dies führt, über einen bisher noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus, zur Aufrechterhaltung der erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration. Nachfolgend wird die kalziumvermittelte Exozytose von akrosomalen Vesikeln eingeleitet. Letztendlich werden bei der akrosomalen Reaktion hydrolysierende Enzyme aus dem Akrosom freigesetzt, welche mit der Zona Pellucida reagieren. Dies ermöglicht dem Spermium die Passage durch diese Schicht und somit eine Fusion mit der Membran der Oozyte (*Allison and Hartree 1970; Ward, Storey et al. 1992; Evans and Florman 2002; Jungnickel, Sutton et al. 2007*). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit der Bikarbonat-vermittelten frühen Aktivierung von Spermien, die den späten Effekten von Bikarbonat, wie z.B. Kapazitation gegenüber gestellt werden muss.

1.4 Carboanhydrasen

Die Familie der Carboanhydrasen (CA) sind Enzyme, bei denen erstmals Metallionen als Kofaktoren nachgewiesen wurden. Sie katalysieren die folgende reversible Reaktion:



Aufgrund dessen übernehmen sie eine entscheidende Rolle bei der Säure-Base-Homöostase von Kohlendioxid (CO_2) und Bikarbonat (HCO_3^-). Bisher sind 14 paraloge Isoformen (I-XIV) des Enzyms bekannt, wobei diese subzellulär unterschiedlich lokalisiert sind. Man unterscheidet zwischen zytosolischen (CA I, II, III, VII, XIII), membran-assoziierten (CA IV, IX, XII, XIV), mitochondrialen (CA V) und sezernierten Carboanhydrasen (CA VI). Die zytosolische CA II ist in Erythrozyten in großen Mengen nachweisbar. Kohlendioxid diffundiert in den Kapillaren in die Erythrozyten und wird dort mit Hilfe der CA II zusammen mit H_2O zu Bikarbonat und Protonen umgesetzt. In der Lunge katalysiert die CAII die Rückreaktion zu CO_2 und übernimmt daher eine wichtige Rolle beim Abtransport von Kohlendioxid. Außerdem wurde CA II bereits mittels immunhistochemischer Methoden in vielen verschiedenen Arten von Epithelzellen, beispielsweise des Gastrointestinaltrakts, der Nierentubuli sowie der Speicheldrüsen nachgewiesen (*Kumpulainen 1979; Spicer, Sens et al. 1982; Kadoya, Kuwahara et al. 1987; Parkkila, Kaunisto et al. 1990*). In Parietalzellen des Magenepithels ist CA II an der Produktion der Magensäure beteiligt, indem

sie Bikarbonat und Protonen aus CO_2 und Wasser produziert. Bikarbonat wird hierbei im Austausch gegen Chlorid über die basolaterale Membran aus der Zelle transportiert und dem Blutgefäßsystem zugeführt. An der apikalen Membran gelangt Chlorid über einen Chloridkanal ins Magenlumen und bildet dort zusammen mit den Protonen, welche im Austausch gegen Kaliumionen über eine H^+/K^+ -ATPase aus der Zelle transportiert werden, die Magensäure (Cordat and Casey 2009). Die extrazellulär lokalisierte CA IV ist ein GPI-verankertes Protein (Waheed, Zhu et al. 1992), welches ebenfalls bereits in vielen unterschiedlichen Geweben und Zelltypen wie z.B. Auge, Erythrozyten, Gastrointestinaltrakt, Gehirn, Lunge sowie in der Niere nachgewiesen wurde (Ghandour, Langley et al. 1992; Fleming, Parkkila et al. 1995; Kaunisto, Parkkila et al. 1995; Wistrand, Carter et al. 1999; Rebello, Ramesar et al. 2004; Shah, Ulmasov et al. 2005; Svichar, Waheed et al. 2009). Im Auge übernimmt CA IV eine Schlüsselrolle bei der Produktion des Kammerwassers. Daher kann durch Gabe des CA-Inhibitors Azetazolamid (AZA) die übermäßige Produktion von Kammerwasser reduziert und somit eine Absenkung des Augeninnendrucks erzielt werden (Glaukomtherapie). In der Niere ist CA IV für die Bikarbonatresorption aus dem Primärharn notwendig. Hierbei werden von den proximalen Tubuluszellen der Niere Protonen im Austausch gegen Natriumionen in das Lumen des Nierentubulus abgegeben. Dort reagiert filtrierte Bikarbonat aufgrund der Aktivität der extrazellulären CA IV zusammen mit den Protonen zu Wasser und CO_2 , welches in die proximalen Tubuluszellen diffundiert und dort von

Carboanhydrasen, wie beispielsweise der intrazellulären CA II wieder zu Bikarbonat hydriert wird. Dieses wird über basolateral-lokalisierte Natrium/Bikarbonat-Ko-Transporter wieder dem Blutgefäßsystem zugeführt (*Breton 2001; Cordat and Casey 2009*). Die zuletzt entdeckte extrazellulär aktive CA XIV ist im Gegensatz zu CA IV nicht über einen GPI-Anker mit der Membran verbunden, sondern gehört zu den Transmembranproteinen (*Fujikawa-Adachi, Nishimori et al. 1999*) und wurde ebenfalls bereits in vielen Geweben wie Gehirn, Niere, Herz, Skelettmuskulatur, Lunge und Leber nachgewiesen (*Mori, Ogawa et al. 1999*). In der Niere übernimmt CA XIV die gleiche Funktion wie CA IV, ist jedoch in anderen Abschnitten des Nephrons lokalisiert (*Parkkila, Parkkila et al. 2000*). Zudem wird eine Involvierung der CA XIV in die Weiterleitung exzitatorischer Signale im Gehirn diskutiert (*Parkkila 2000*). Im Nebenhoden konnte bereits gezeigt werden, dass CA II und CA IV am Mechanismus der Sekretansäuerung beteiligt sind (*Kaunisto, Parkkila et al. 1995*). In Spermien wird die Rolle von CAs bei der frühen Aktivierung durch Bikarbonat diskutiert. Die bei diesem Mechanismus involvierten CA-Isoformen sowie deren genaue Funktionen sind unbekannt. Unsere Arbeitsgruppe konnte die Anwesenheit von CA IV in der Membran muriner Spermien bereits erfolgreich nachweisen. Es wurde allerdings beobachtet, dass die CA IV erst in Spermien des Nebenhodenkörpers und der darauffolgenden Nebenhodenabschnitte nachweisbar ist, jedoch nicht in Spermien des Nebenhodenkopfes oder während der Spermatogenese. Dies spricht für die Hypothese von Eckstedt et al. welche besagt, dass das CA IV-

Protein vom Nebenhodenepithel gebildet und auf die Plasmamembran der Spermien transferiert wird (*Ekstedt, Holm et al. 2004*). In dieser Arbeit wurde die Rolle der Carboanhydrasen II, IV und XIV bei der frühen Aktivierung von Spermien untersucht.

1.5 Natrium/Bikarbonat-Ko-Transporter 1 (NBC1)

In der Physiologie von Säugern spielt der Transport von Bikarbonat über die Zellmembran eine zentrale Rolle. Es konnten bisher 14 Gene identifiziert werden, welche für Proteine mit Bikarbonat-Transportaktivität kodieren. Diese Proteine lassen sich in elektrogene Chlorid/Bikarbonat-Austauscher, elektroneutrale Chlorid/Bikarbonat-Austauscher sowie Natrium-gekoppelte Bikarbonat-Ko-Transporter (NBC) unterteilen. Letztere nutzen den hohen einwärts-gerichteten Natriumgradient von Säugerzellen als treibende Kraft für den Bikarbonat-Import und können nochmals in elektroneutrale (NBCn1) und elektrogene (NBCe1, NBCe2) Natrium/Bikarbonat-Ko-Transporter unterteilt werden. Bei NBCe1 (auch als NBC1 oder SLC4A4 bezeichnet) kann, abhängig vom Ort der Expression sowie dem Phosphorylierungsgrad des Proteins, entweder eine Kopplungsstöchiometrie von 2:1 oder 3:1 ($\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$) vorliegen (*Gross, Hawkins et al. 2001; Gross, Hawkins et al. 2001; Gross and Kurtz 2002*). NBC1 wurde als der Natrium/Bikarbonat-Ko-Transporter in der Niere identifiziert, welcher in der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen im Zusammenspiel mit CA II und CA IV für die

Bikarbonatresorption aus dem Primärharn verantwortlich ist (*Breton 2001; Cordat and Casey 2009*). Außerdem wurde NBC1 schon in vielen weiteren Geweben wie Pankreas, Herz, Kornea, Prostata, Kolon, Schilddrüse sowie Gehirn nachgewiesen (*Boron, Hediger et al. 1997; Boron, Fong et al. 1997; Burnham, Amlal et al. 1997; Romero, Hediger et al. 1997; Abuladze, Lee et al. 1998; Romero and Boron 1999; Bevensee, Schmitt et al. 2000; Sun and Bonanno 2003*). Der Mechanismus des Bikarbonatimports in Spermien ist noch weitgehend ungeklärt. Es wurde gezeigt, dass CA IV und NBC1 sowohl physikalisch als auch funktionell miteinander interagieren (*Alvarez, Loiselle et al. 2003*). Da die extrazelluläre CA IV in Spermien bereits nachgewiesen wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Anwesenheit von NBC1 sowie dessen Rolle in der frühen Aktivierung von Spermien überprüft werden.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Anhand von Microarray-Daten konnte gezeigt werden, dass im Genitaltrakt der Maus eine erhöhte Expression der Carboanhydrasen II, IV und XIV auftritt. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Mausmodell die Rolle der Carboanhydrasen II, IV und XIV bei der Bikarbonat-induzierten frühen Aktivierung von Spermien untersucht werden. Zudem wurde überprüft, ob NBC1 in Spermien nachweisbar und ebenfalls in diesen Mechanismus involviert ist. Hieraus ergaben sich folgende konkrete Fragestellungen:

- 1. Wird die Erhöhung der Schlagfrequenz von Spermien außer durch HCO_3^- auch durch CO_2 induziert?**
- 2. Ist in Spermien die enzymatische Aktivität von Carboanhydrasen nachweisbar?**
- 3. Sind Carboanhydrasen in den Mechanismus der Schlagfrequenzerhöhung von Spermien involviert?**
- 4. Welche Rolle spielen hierbei die beiden extrazellulären CA-Isoformen IV und XIV, sowie die intrazelluläre CAII?**
- 5. Sind in Spermien Bikarbonat-Transporter für den Import von Bikarbonat verantwortlich oder diffundiert dieses in Form von CO_2 über die Plasmamembran?**
- 6. Ist der Natrium/Bikarbonat-Ko-Transporter NBC1 in Spermien nachweisbar und am Mechanismus des Bikarbonatimports bei der frühen Aktivierung von Spermien beteiligt?**

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Elektrophorese und Blotting Apparatur:

X Cell Sure Lock Electrophoresis Cell	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
---------------------------------------	------------------------------

X Cell II Blot Module	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
-----------------------	------------------------------

Brutschrank: CO ₂ Inkubator MCO-5AC	Sanyo, München
--	----------------

Entwicklermaschine: Curix 60	AGFA, Köln
------------------------------	------------

Feinwaage: Explorer Pro	OHAUS, Pine Brook NJ, USA
-------------------------	---------------------------

Gas Bubbler: GBM10	Warner Instruments, Hamden CT, USA
--------------------	------------------------------------

Heizblock	Grant, Cambridge, GB
-----------	----------------------

Hochgeschwindigkeitskamera: M3	NIKON, Tokyo, Japan
--------------------------------	---------------------

Magnetrührer: IKAMAG RET-G	IKA, Staufen
----------------------------	--------------

MedeaLAB CASA System v5.5	Medical Technology, Altdorf
---------------------------	-----------------------------

Mikromanipulator: Taurus R	WPI, Sarasota, FL
----------------------------	-------------------

Mikroskop Inkubator System: Tokai Hit	Spectra Services, Ontario NY, USA
---------------------------------------	-----------------------------------

Mikroskope:

Diaphot 300	NIKON, Tokyo, Japan
-------------	---------------------

Eclipse TE2000-U	NIKON, Tokyo, Japan
------------------	---------------------

Laser Scanning Mikroskop Eclipse TE2000-E	NIKON, Tokyo, Japan
Axiophot	Zeiss, Jena
Molecular Imager: Chemi Doc XRS+	BIO-RAD, München
Monochromator: Polychrome IV	TILL Photonics, Gräfelfing
Elektrophoresekammer:	
Wide Mini-Sub Cell GT	BIO-RAD, München
PCR-Cycler: G-Storm	AlphaMetrix, Rödermark
Perifusionsanlage: VC-8 valve controller	Warner Instruments, Hamden CT, USA
pH-Meter: Seven Multi	Mettler Toledo, Giessen
Photometer: Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (1 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	diverse Hersteller
Quadrupole Massenspektrometer:	
MSD 5970	Hewlett Packard, Waldbronn
Stromquellen:	
Power Ease 500	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Power Pac 200	BIO-RAD, München
Tischzentrifuge: Galaxy 16 DH	VWR, Darmstadt
Vortex-Mixer	VWR, Darmstadt
Rüttler, rotatorisch: OS-500	VWR, Darmstadt
Zentrifuge: 3-18K	SIGMA, Steinheim

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Gele	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Nitrocellulose Membran	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Petrischalen 35 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	VWR, Darmstadt
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	VWR, Darmstadt
Fluoro Dishes FD35	WPI, Sarasota FL, USA

2.1.3 Chemikalien

Baxter, Unterschleißheim:

Isofluran (#HDG9623)

BIO-RAD, München:

Proteinmarker: Kaleidoscope Prestained Standards (#161-0324)

GE Healthcare, Fairfield CT, USA:

ECL Western-Blotting Detection Reagent (#RPN2209)

Invitrogen, Carlsbad CA, USA:

Pluronic F-127 (#488323)

TrackIt 100bp DNA Ladder (#4984.2)

Merck, Darmstadt:

Ponceau-S (#C.I.27195)

Pierce, Rockford IL, USA:

BCA Protein Kit (#23225)

Roth, Karlsruhe:

2-Mercaptoethanol (#4227.3)

Bromphenolblau (#A512.1)

Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) (#4984.2)

Glycerin (#7530.1)

Glycin (#3790.2)

Hämatoxylinlösung (#CN04.1)

Kaliumchlorid (KCl) (#6781.3)

Roti-Block 10x (#A151.2)

di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) (#4984.2)

Natriumhydroxid (NaOH) (#6771.3)

Triton X 100 (#3051.3)

SIGMA, Steinheim:

4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid sodium salt hydrate
(DIDS) (#D3514)

Acetazolamid (#A6011)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (#D8418)

Kalziumdichlorid (CaCl_2) (#C1016)

Ethoxyzolamid (#333328)

Magnesiumchlorid (MgCl_2) (#M8266)

N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)
(#H3375)

N-methyl-D-glucamin (NMDG) (#66930)

Natrium DL-Laktat (#L1375)

Natriumhydrogencarbonat (#S-8875)

Pyruvat (#P8574)

Tris[hydroxymethyl]aminomethanhydrochlorid
Ethylendiamintetraessigsäure (#T-3253)

VWR, Darmstadt:

Aceton (#20066.321)

Isopropanol (2-Propanol) (#20842.323)

Methanol (#20847.320)

Natriumchlorid (NaCl) (#27810295)

Tween 20 (#28829.183)

Zentrales Chemikalienlager Universität Saarbrücken:

Ethanol 99%

Formaldehyd

Salzsäure (HCl) rauchend 37%

2.1.4 Standardlösungen

Avidin-Stammlösung

15,2 mM Avidin

15,4 M Natriumazid

in 1 x PBS, pH 7,2

BCECF

1:100 BCECF-Stocklösung in HS-Puffer

3,1 µl BCECF (1:100) zu 500 µl Spermisuspension

Biotin-Stammlösung

4,1 M Biotin

15,4 M Natriumazid

in 1 x PBS, pH 7,2

3,3'-Diaminobenzidin (DAB)

1,4 mM 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)

in 1 x TBS pH 7,6 bei -20°C lagern

3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Gebrauchslösung

1 ml 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (2,4M)

DAB 2 min bei 2000 xg abzentrifugieren und den Überstand mit 10 µl der folgenden Lösung versetzen:

4% Wasserstoffperoxid (30%) in Aqua dest.

DNA-Probenauftragspuffer

0,2% Sodiumdodecylsulfat (SDS)

50% Glycerin

0,05% Bromphenolblau

0,05% Xylencyanol

in Aqua dest.

Glucoseoxidase-Puffer

10 mM Glucose
1 mM Natriumazid
0,4 U/ml Glucoseoxidase
in 1 x PBS

Homogenisierungspuffer für Proteinextraktion

100 mM NaCl
10 mM HEPES
2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
1 mM Dithiothreitol DTT
2% Triton X 100
in Aqua dest.
Der pH-Wert wird mit 5% HCl auf 7,3 eingestellt.

2 x HS-Puffer (Stammlösung)

269,8 mM NaCl
10 mM KCl
2 mM MgCl_2
4 mM CaCl_2
In Aqua dest.

HS-Gebrauchslösung

1 x HS-Stammlösung

8,75 mM Glucose

20 mM HEPES

10 mM Natrium DL-Laktat

1 mM Pyruvat

in Aqua dest.

Der pH-Wert wird mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt.

Lysepuffer für Gewebeverdau

88 µl H₂O dest.

10 µl 10 x PCR Puffer

2 µl Proteinase K

20 x MES-running-buffer

1 M 2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure MES

1 M Tris[hydroxymethyl]aminomethan

69,4 mM Sodiumdodecylsulfat (SDS)

20,5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

in Aqua dest.

10 x PCR-Puffer

500 mM KCl

100 mM Tris-Chlorid

22,5 mM MgCl_2

5% DMSO

in Aqua dest. (sterilfiltriert)

10 x Phosphate-buffered saline (PBS)

1,4 M NaCl

26,8 mM KCl

80 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

14,7 mM KH_2PO_4

Die Salze werden in Aqua dest. gelöst und der pH-Wert mit 5% HCl auf 7,2 eingestellt.

PBS-BSA (Bovines-Serum-Albumin)

5% BSA in 1 x PBS im Wasserbad bei 37°C lösen ohne zu schütteln

Ponceau-Rot-Lösung

0,1% Ponceau-Rot

in 2% Essigsäure

Proteinase K Enzym-Lösung

10 mg/ml Proteinase K

in Aqua dest.

Roti-Block

1% Roti Block

in Aqua dest.

50 x TAE-Puffer

0,05 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

2 M Tris[hydroxymethyl]aminomethan

1 M Essigsäure 100%

in Aqua dest.

Der pH-Wert wird mit konzentrierter Essigsäure auf pH 8,3 eingestellt.

Transfer-Puffer

1:20 Transfer Puffer 20 x

1:10 Methanol

1:800 Antioxidant

in Aqua dest.

1 x Tris buffered saline (TBS)

154 mM NaCl

50 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethan

Die Salze werden in Aqua dest. gelöst und der pH-Wert mit konz. HCl auf 7,6 eingestellt.

1 x Tris buffered saline Tween 20 (TBS-T)

1% Tween in 1 x TBS

Vectastain[®]

1:50 Vectastain-Lösung A (Avidin)

1:50 Vectastain-Lösung B (biotinyliertes Enzym)

in 1 x PBS pH 7,2 (Lösung wird 30 min vor Gebrauch angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert)

2.1.5 Primer

Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

CA2f: 5'-CTG CAC GCT ATT TTT TGA AGA TTG GAC CTG CGT CA-3'

CA5R: 5'-TGG AAG CAA TTA TTT ACT CCG GTA AAC TG-3'

CA4K/OE25': 5'-CAC CCT TCA TCC TCG TCG GCT ATG ACC AAA AGC-3'

CA4/OINTRON1A5': 5'-TGA GGT CAA TTC CCA GCT CCC ACA TTG TTG C-3'

CA4K/OEXON63': 5'-TGT GGA TCT TGA TGG GTT GTT TGT ACA CAG TCC-3'

CA14intron35': 5'-AGG CTC CTG CAG CTA AGG TGG GAT CAG ACG-3'

CA14intron43': 5'-TCC ATC CTC TGA GCT CCA CTG GAC CGA AAC-3'

2.1.6 Software

AxoScope, v9.0 (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA)

Igor Pro v6.04 (WaveMetrics, Lake Oswego OR, USA)

Image J v1.37 (NIH, Freeware)

MedeaLAB CASA System, v5.5 (Medical Technology GmbH, Altdorf)

MetaMorph v7.1 (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA)

PASW Statistics 18 (SPSS GmbH, München)

OriginPro v7.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebeentnahme und Gewebeverdau

Zur Identifikation des Genotyps von Mäusen wird DNA aus einer Gewebeprobe gewonnen. Hierzu wird die drei Wochen alte Maus unter einer Sterilbank im Nacken mit der Hand fixiert, und mithilfe einer Lochzange wird aus dem Ohr ein 2 mm großes Gewebestück ausgestanzt. Dieses wird in steriles Eppendorfgefäß überführt und mit 100 µl Lysepuffer versetzt, welcher zum Aufschluss der Zellen eine Serinprotease enthält. Aufgrund der Tatsache, dass die im Puffer enthaltene Proteinase K ihre optimale Enzymaktivität bei 55°C entfaltet, wird die Gewebeprobe über Nacht bei 55°C im Heizblock lysiert. Am darauffolgenden Tag erfolgt die Hitzeinaktivierung der Proteinase K bei 95°C für 20 min. Bis zur weiteren Verwendung ist eine Lagerung der lysierten Gewebeprobe bei 4°C möglich.

2.2.2 Genotypisierung

2.2.2.1 PCR:

Die DNA der lysierten Gewebeprobe wird zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR) mit spezifischen Primern für das jeweilige CA-Gen verwendet. Mithilfe der PCR lassen sich gezielt Genabschnitte amplifizieren. Als Startpunkt für die

Polymerase, die den komplementären DNA-Strang des entsprechenden Genabschnitts verlängert, dienen die freien 5'-OH-Enden der sequenzspezifischen Primer. Der Reaktionsverlauf gliedert sich in eine Denaturierungsphase (92°C-98°C), die Anlagerung der Primer (primerdefinierte Temperatur) sowie die Phase der Primerverlängerung (72°C). Aus der Wiederholung dieser Zyklen (30 bis 35 Zyklen) resultiert die exponentielle Amplifikation des gewünschten Genabschnitts. Nach erfolgreicher Auftrennung des PCR-Produkts in einem Agarosegel kann die Allelform des jeweiligen CA-Gens und somit der Genotyp bestimmt werden. Nachfolgend sind die Pipettierschemata für die Mastermixe sowie die zugehörigen PCR-Programme der verschiedenen CA-PCRs aufgeführt:

CA II PCR:

Pipettierschema für 1 Ansatz:

CA2f – Primer (20 µM)	1 µl
CA5R – Primer (20 µM)	1 µl
DNTP-Mix (10mM)	1 µl
10 x PCR-Puffer	5 µl
H ₂ O dest.	38,5 µl
<u>Taq-Polymerase (1 U/µl)</u>	<u>0,5 µl</u>

47 µl

+ Gewebeverdau 3 µl

PCR-Programm:

94°C 3 min	1 x
95°C 45 s	} 35 x
63°C 30 s	
72°C 30 s	
72°C 7 min	} 1 x
4°C ∞	

Die amplifizierten CA II Allele unterscheiden sich insofern, dass im Mutanten-CA II-Allel aufgrund einer Q153X Mutation im Gegensatz zum Wildtyp-Allel keine Restriktionsschnittstelle für die Restriktionsendonuklease Tsp45I vorhanden ist. Daher erfolgt im Anschluss an die PCR ein 2 stündiger Restriktionsverdau bei 65°C nach folgendem Ansatz:

NEB1-Puffer (10 x)	2 µl
BSA (10 x)	2 µl
Tsp45I (4 U/µl)	1 µl
<u>H₂O dest.</u>	<u>5 µl</u>
	10 µl
+ PCR-Produkt 10 µl	

Sowohl der PCR-Ansatz als auch der Restriktionsverdau werden auf Eis zusammen pipettiert. Im Anschluss an den Verdau werden die Proben zur gelelektrophoretischen Auftrennung mit 5 x DNA-Ladepuffer versetzt und bei 4°C gelagert.

CA IV PCR:

Pipettierschema für 1 Ansatz:

PCR-Programm:

CA4K/OINTRON1A5' – Primer (20 µM)	1,25 µl	94°C	2 min	1 x
CA4K/OE25' – Primer (20 µM)	1,25 µl	94°C	15 s	} 10 x
CA4K/OEXON63' – Primer (40 µM)	1,25 µl	68°C	60 s	
DNTP-Mix (10 mM)	1,25 µl	94°C	15 s	} 20 x
DMSO	2,5 µl	68°C	60 s	
10 x PCR-Puffer	5 µl	(autoextension + 20 s/cycle)		
H ₂ O dest.	34 µl	68°C	10 min	} 1 x
<u>Taq-Polymerase (1 U/µl)</u>	<u>0,5 µl</u>	4°C	∞	
	47 µl			
+ Gewebeverdau	3 µl			

Die hierbei verwendeten Primer unterscheiden sich in ihrer Sequenzspezifität in Bezug auf das Wildtyp- bzw. Mutanten-CA IV-Allel, welches eine Deletionsmutation beinhaltet. Demnach werden bei der PCR drei Primer verwendet, da für die Amplifikation des Wildtyp- und Mutanten-CA IV-Allels zwei verschiedene forward-Primer benötigt werden. Die PCR Amplifikate werden zur gelelektrophoretischen Auftrennung mit 5 x DNA-Ladepuffer versetzt und bei 4°C gelagert.

CA XIV PCR:

Pipettierschema für 1 Ansatz:

PCR-Programm:

CA14i35' – Primer (20 µM)	1 µl	94°C 2 min	1 x
CA14i43'' – Primer (20 µM)	1 µl	92°C 15 s	} 30 x
DNTP-Mix (10 mM)	1,2 µl	68°C 2 min	
DMSO	2,5 µl	(autoextension + 2 s/cycle)	
PCR-Puffer	5 µl	68°C 10 min	} 1 x
H ₂ O dest.	35,8 µl	4°C ∞	
<u>Taq-Polymerase (1 U/µl)</u>	<u>0,5 µl</u>		
	47 µl		
+ Gewebeverdau	3 µl		

Die PCR Amplifikate werden zur gelelektrophoretischen Auftrennung mit 5 x DNA-Ladepuffer versetzt und bei 4°C gelagert.

2.2.2.2 Gelelektrophorese und Auswertung der Genotypisierung:

Unter Elektrophorese versteht man generell die Wanderung von positiv oder negativ geladenen Molekülen im elektrischen Feld, in einer Lösung oder einer Trägermatrix. Bei der Gelelektrophorese wandern DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe nach Anlegen einer Spannung (80 V)

unterschiedlich schnell durch das Agarosegel, da die Wanderungsgeschwindigkeit von der DNA-Fragmentgröße sowie von der Maschengröße des Gels abhängig ist. Um die Größe der verschiedenen DNA-Fragmente zu bestimmen, wird ein DNA-Größenmarker (10 µl), welcher DNA-Fragmente bekannter Größe beinhaltet, mit aufgetragen. Um eine Diffusion der DNA-Proben aus den Probestaschen zu vermeiden, enthält der DNA-Ladepuffer Glycerin sowie Bromphenolblau, welches zur Blaufärbung der Probe führt und somit als Anhaltspunkt für die Wanderung der DNA im Gel dient. Zur Herstellung von Agarosegelen wird die jeweilige Menge Agarose in 1 x TAE Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen mit Ethidiumbromid (0,007%) versetzt, welches mit der DNA interkaliert und somit eine Analyse am UV-Detektor ermöglicht. Nach erfolgreicher Auftrennung kann anhand der Fragmentgrößen auf den Genotyp zurückgeschlossen werden.

CA II:

Die Auftrennung der CA II PCR-Amplifikate findet in einem 3% Agarosegel statt. Das PCR-Amplifikat des Wildtyp-Allels besitzt eine Größe von 195 bp. Aufgrund der, im Gegensatz zum Mutanten-CA II-Allel, im Wildtyp-Allel vorhandenen Restriktionsschnittstelle für Tsp45I erhält man nach dem Restriktionsverdau und der gelelektrophoretischen Auftrennung im Falle des Wildtyp-Allels zwei Banden (162 bp und 34 bp), während im Falle des Mutanten-CA II-Allels nur eine Bande bei 195 bp detektierbar ist. Somit kann

man Tiere, welche nur eine Bande bei 195 bp aufweisen, als homozygote CA II KO-Tiere (-/-) klassifizieren, während zwei Banden (162 bp und 34 bp) auf ein Wildtyp-Tier (+/+) hindeuten. Sind drei Banden erkennbar (195 bp, 162 bp und 34 bp), so besitzt das untersuchte Tier sowohl ein Wildtyp- als auch ein Mutanten-CA II-Allel und wird in Bezug auf das CA II-Allel als heterozygot (+/-) bezeichnet.

CA IV:

Die Auftrennung der CA IV PCR-Amplifikate findet in einem 1% Agarosegel statt. Das PCR-Amplifikat des Wildtyp-Allels besitzt eine Größe von 1441 bp, während im Falle des Mutanten-CA IV-Allels eine Bande bei 880 bp detektierbar ist. Somit kann man Tiere, welche nur eine Bande bei 880 bp aufweisen, als homozygote CA IV KO-Tiere (-/-) klassifizieren, während eine Bande bei 1441 bp auf ein Wildtyp-Tier (+/+) hindeutet. Sind zwei Banden erkennbar (1441 bp und 880 bp), so besitzt das untersuchte Tier sowohl ein Wildtyp- als auch ein Mutanten-CA IV-Allel und wird in Bezug auf das CA IV-Allel als heterozygot (+/-) bezeichnet.

CA XIV:

Die Auftrennung der CA XIV PCR-Amplifikate findet in einem 2% Agarosegel statt. Das PCR-Amplifikat des Wildtyp-Allels besitzt eine Größe von 350 bp, während im Falle des Mutanten-CA XIV-Allels eine Bande bei 200 bp detektierbar ist. Somit kann man Tiere, welche nur eine Bande bei 200 bp

aufweisen, als homozygote CA XIV KO-Tiere (-/-) klassifizieren, während eine Bande bei 350 bp auf ein Wildtyp-Tier (+/+) hindeutet. Sind zwei Banden erkennbar (350 bp und 200 bp), so besitzt das untersuchte Tier sowohl ein Wildtyp- als auch ein Mutanten-CA XIV-Allel und wird in Bezug auf das CA XIV-Allel als heterozygot (+/-) bezeichnet.

2.2.3 Spermienpräparation

Zur Gewinnung von murinen Spermien ist die Entnahme des Nebenhodens erforderlich. Hierzu wird die Maus, nach Narkotisierung mit Isofluran, zunächst durch Genickbruch getötet. Nach Entnahme beider Nebenhodenschwänze sowie beider Samenleiter eines Tieres werden diese in eine Petrischale mit 1 ml HS-Puffer überführt. Daraufhin werden die Nebenhodenschwänze mehrmals eingeschnitten und die Samenleiter ausgestrichen, um eine möglichst hohe Spermienausbeute zu erzielen. Es folgt eine 20 minütige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂, welche es den Spermien ermöglicht, aufgrund ihrer Eigenmotilität aus dem Gewebe auszuschwimmen und als „swim out“ bezeichnet wird. Anschließend folgen zwei Waschschrte. Hierbei wird die Spermien suspension zunächst auf vier Eppendorfgefäße, welche je 250 µl HS-Puffer enthalten, verteilt. Nach 3 minütiger Zentrifugation bei 400 x g wird der Überstand verworfen und je zwei Spermienpellets unter Zugabe von 500 µl HS-Puffer gepoolt. Dieser

Schritt wird wiederholt, sodass man letztendlich ein Eppendorfgefäß mit etwa 500 µl Spermien suspension erhält.

2.2.4 Computergestützte Spermien Analyse (CASA, computer-assisted sperm analysis)

Die computergestützte Motilitätsanalyse (CASA) der Spermienproben wurde mit dem MedeaLAB CASA System, Version 5.5 (Medical Technology GmbH, Altdorf, Germany) durchgeführt. Die verwendete Messapparatur beinhaltet ein Phasenkontrastmikroskop (Olympus CX41) mit beheizbarem Kreutztisch, einen Bilddigitalisierer sowie eine Kamera, welche die mikroskopischen Bilder auf den Computer überträgt.

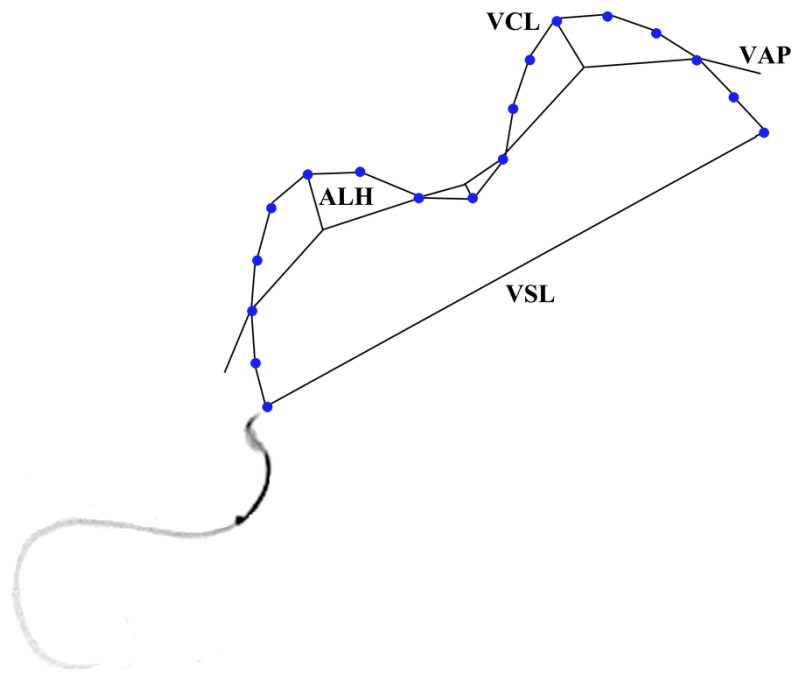


Abbildung 2: Schematische Darstellung der erfassten Parameter, bei der Durchführung einer computergestützten Motilitätsanalyse (CASA): average pathway velocity (VAP), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL) und lateral head amplitude (ALH).

Bei der Messung werden die folgenden Parameter erfasst: average pathway velocity (VAP: durchschnittliche Geschwindigkeit des geglätteten Werts, den die Zelle zurücklegt ($\mu\text{m/s}$)), straight line velocity (VSL: durchschnittliche Geschwindigkeit gemessen anhand einer geraden Linie zwischen Startpunkt und Endpunkt der zurückgelegten Strecke ($\mu\text{m/s}$)), curvilinear velocity (VCL: durchschnittliche Geschwindigkeit gemessen über die eigentliche Punkt-zu-Punkt-Strecke, die die Zelle zurücklegt ($\mu\text{m/s}$)), lateral head amplitude (ALH: Amplitude der lateralen Auslenkung des Spermienkopfes (μm)), linearity (LIN: Mittelwert der Ratio VSL/VCL in %) (Abbildung 2). Gemäß ihrer Geschwindigkeiten werden Spermien in eine der folgenden vier Kategorien eingeteilt: schnell (linear) progressive ($\text{VAP} > 25 \mu\text{m/s}$); langsam (nicht

linear) progressive ($25 \mu\text{m/s} > \text{VAP} > 5 \mu\text{m/s}$); unprogressive (local) ($< 5 \mu\text{m/s}$) und immotile Spermien.

Zur Durchführung der Messung werden die Spermien nach dem Waschen in vorgewärmten HS-Puffer überführt, welcher 5% BSA enthält, um die Adhäsion der Spermien an Oberflächen zu verhindern. Daraufhin werden 20 μl der Spermien suspension in eine vorgewärmte (37°C) Zählkammer (Makler, Sefi-Medical Instruments Ltd., Biosigma S.r.l., Italy) pipettiert. Die Ergebnisse der Messungen wurden in Microsoft Excel gesammelt und als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

2.2.5 Analyse der Schlagfrequenz von Spermien

Die Schlagfrequenzanalyse besitzt im Gegensatz zur CASA-Messung den entscheidenden Vorteil, dass die exakte Schlagfrequenz sowie die Amplitude des schlagenden Flagellums eines einzelnen Spermiums erfasst werden kann und mittels Mikroperfusion pharmakologische Protokolle appliziert werden können. Zur Durchführung der Messung werden zunächst 10 bis 20 μl Spermien suspension auf den Glasboden eines Fluoro Dishs pipettiert.

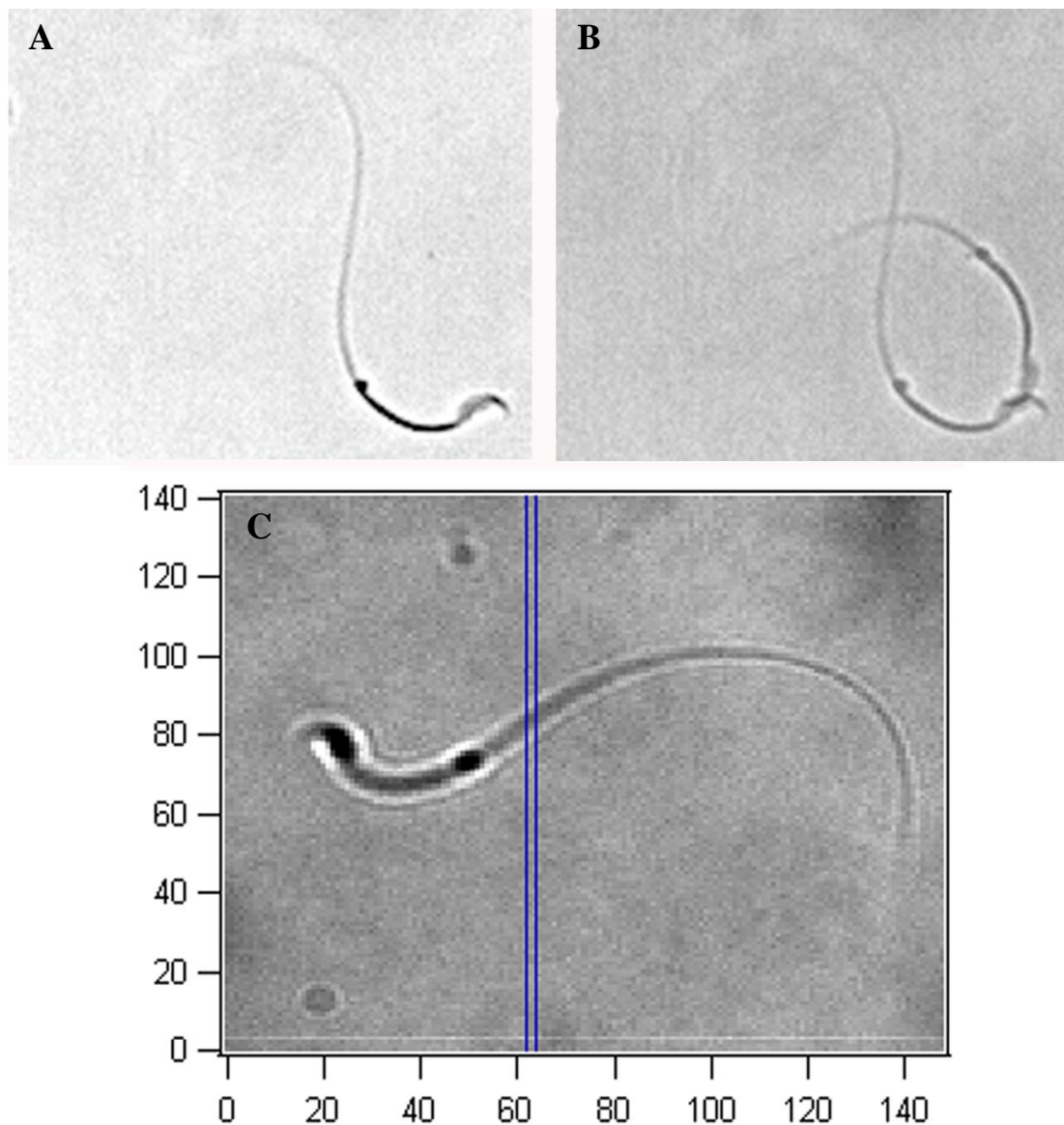


Abbildung 3: A: Einzelbild eines murinen Spermiums. B: Übereinander gelagerte Bilder mit maximalem Ausschlag des Flagellums. C: Zur Durchführung der Berechnung der Schlagfrequenz, mit dem Kopf nach links ausgerichtetes Spermium.

Daraufhin lässt man die Spermien für 1 bis 2 Minuten mit dem Kopf am Glasboden adhären, bevor der Boden der Petrischale vollständig mit HS-Puffer bedeckt wird. Bei der Messung, welche mit einem 20 x Objektiv an einem Nikon Diaphot 300 Mikroskop durchgeführt wurde, werden mit Hilfe

einer Hochgeschwindigkeitskamera Bilder von Spermien mit einer Bildfrequenz von 150 Hz aufgenommen. Die Auswertung des Bildstapels gliedert sich in verschiedene Schritte, für die jeweils ein spezieller Rechenalgorithmus angewendet wird. Aus dem Film, welcher das gesamte Gesichtsfeld repräsentiert wird zunächst gezielt ein Spermium ausgewählt und ausgeschnitten. Außerdem werden Helligkeit sowie Kontrast der Einzelbilder des neuen Bildstapels angepasst (Abbildung 3A). Daraufhin werden zwei Bilder des Stapels ermittelt, in welchen die Auslenkungen des Flagellums ein Maximum erreicht und in einem so genannten sum-file übereinander gelagert (Abbildung 3B). Dieses sum-file stellt die Grenzen eines Bewegungszyklus des Spermiums in einem Einzelbild dar und ist essentiell für die nachfolgende Analyse. Hierbei wird die Schlagfrequenz des ausgewählten Spermiums ermittelt. Dazu muss zunächst das zuvor erstellte sum-file durch Drehung und Spiegelung so ausgerichtet werden, dass der Spermienkopf nach links zeigt (Abbildung 3C). Daraufhin werden die Grenzen des maximalen Ausschlags des Spermianschwanzes und somit der Berechnungsbereich festgelegt. Im Anschluss liefert der zugrunde liegende mathematische Algorithmus die Schlagfrequenz in Hz. Diese Werte wurden in Microsoft Excel gesammelt und als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

2.2.6 Messung des intrazellulären pH-Werts

Zur Messung des intrazellulären pH-Werts von Spermien wurde das pH-sensitive Fluorescein-Derivat 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF) verwendet (siehe Abbildung 4).

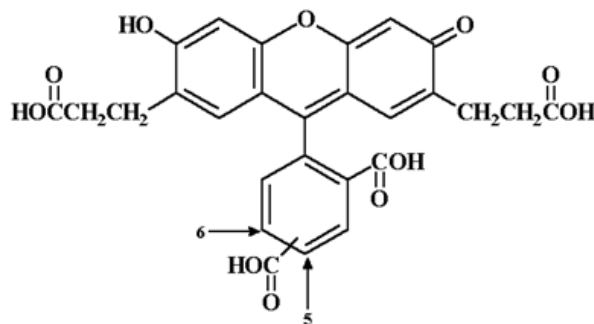


Abbildung 4: Strukturformel von BCECF (2',7'-bis-(2-carboxyethyl))-5-(und-6)-carboxyfluorescein). Bei BCECF-AM sind die Carboxylatgruppen mit Acetoxymethylgruppen (-CH₂OCOCH₃) versehen, die intrazellulär durch unspezifische Esterasen abgespalten werden. Das hydrophile BCECF bleibt dann intrazellulär „gefangen“.

Die optische Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffs bewirkt die Anhebung eines Elektrons auf ein energetisch höheres Niveau. Springt dieses wieder in seinen Ruhezustand zurück, gibt es die frei werdende Energie durch Emission eines Photons ab. Da das Anregungs- und Emissionsverhalten von BCECF abhängig von der H⁺-Konzentration ist, kann man durch Messung des Fluoreszenzsignals den pH-Wert ermitteln. Das Anregungs- und das Emissionsspektrum des BCECF zeigen Maxima bei 505 nm bzw. 535 nm (Rink, Tsien et al. 1982) (siehe Abbildung 5). Die Wellenlängendifferenz zwischen den Anregungs- und Emissionswellenlängen ist farbstoffspezifisch

und wird als „Stokes-Shift“ bezeichnet. Die pH-abhängigen Anregungswellenlängen des BCECF-Moleküls kreuzen sich bei 436 nm. Demnach ist die Farbstoffanregung bei dieser Wellenlänge, dem sogenannten isosbestischen Punkt, pH-unabhängig und lässt Rückschlüsse auf die Farbstoffkonzentration sowie deren Veränderung im Laufe des Experiments beispielsweise durch Ausbleichen zu.

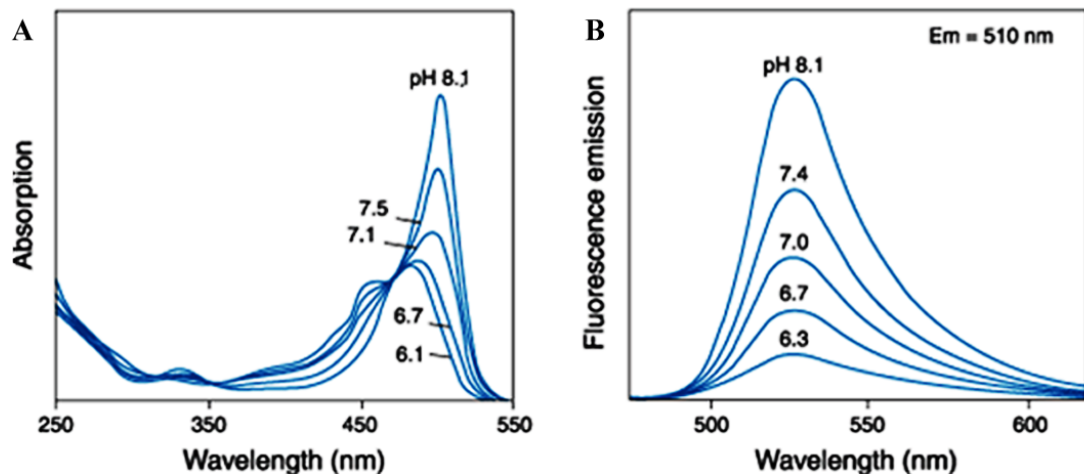


Abbildung 5: Anregungs- (A) und Emissionsspektrum (B) des Fluoreszenzfarbstoffs BCECF. (A) Die Fluoreszenzintensität der Emission bei 535 nm ist abhängig von der jeweiligen Anregungswellenlänge (x-Achse). Die Fluoreszenz des BCECF-Moleküls ist pH-abhängig, die jeweiligen Anregungswellenlängen kreuzen bei 436 nm, dem sogenannten isosbestischen Punkt. (B) Emissionsspektrum des BCECF-Moleküls bei konstanter Anregung von 488 nm.

Die Messung erfolgte daher bei zwei verschiedenen Exzitationswellenlängen (488 nm und 436 nm), wobei die Emission bei pH-abhängiger Anregung von 488 nm durch die Emission bei Anregung des isosbestischen Punktes geteilt wird. Somit erhält man einen Quotienten, der konzentrationsunabhängig und proportional zum pH-Wert ist.

Im Anschluss an die Spermienpräparation erfolgt die Beladung der Spermien mit dem membrangängigen Azetoxymethylester (AM) von BCECF, welcher intrazellulär durch Esterasen abgespalten wird. Zur Beladung wurden 3 µl Pluronic sowie 0,1 µM BCECF-AM zu 250 µl HS-Puffer in ein Eppendorfgefäß pipettiert und 250 µl Spermien suspension zugefügt. Die folgende 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte aufgrund der Lichtempfindlichkeit des BCECF-Moleküls im Dunkeln. Zur Entfernung von überschüssigem extrazellulärem BCECF erfolgte ein weiterer Waschschrift mit frischem HS-Puffer (3 min bei 400 x g). Das Anregungslicht wurde durch einen Monochromator (TILL Photonics, Gräfelfing) erzeugt und durch einen 450 nm – 490 nm Filter (Nikon, Düsseldorf) geleitet. Phototoxizität sowie das Ausbleichen des Fluorophors wurden durch Abschwächung des Anregungslichtes mit Hilfe eines „neutral density filters“ minimiert. Das emmitierte Licht wurde durch ein 40 x SFluor Objektiv an einem Nikon Eclipse TE2000-U Mikroskop gesammelt und mit AxoScope 9 (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA) analysiert.

Zur Eichung des Fluoreszenzsignals wurde der künstliche K^+/H^+ -Austauscher Nigericin verwendet (Thomas, Buchsbaum et al. 1979). Die Kalibrierung erfolgte durch Equilibrierung des extrazellulären und intrazellulären pH-Werts, währenddessen die Spermien Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 6, pH 7, pH 8) umspült wurden und den Ionophor Nigericin in einer Endkonzentration von 10 µM enthielten. Somit ist es möglich, einem bestimmten pH_i -Wert den jeweiligen BCECF-Quotient zuzuordnen. Aus der

durchgeführten Dreipunkteichung ergab sich eine nahezu lineare Eichkurve, welche in Abbildung 6 dargestellt ist.

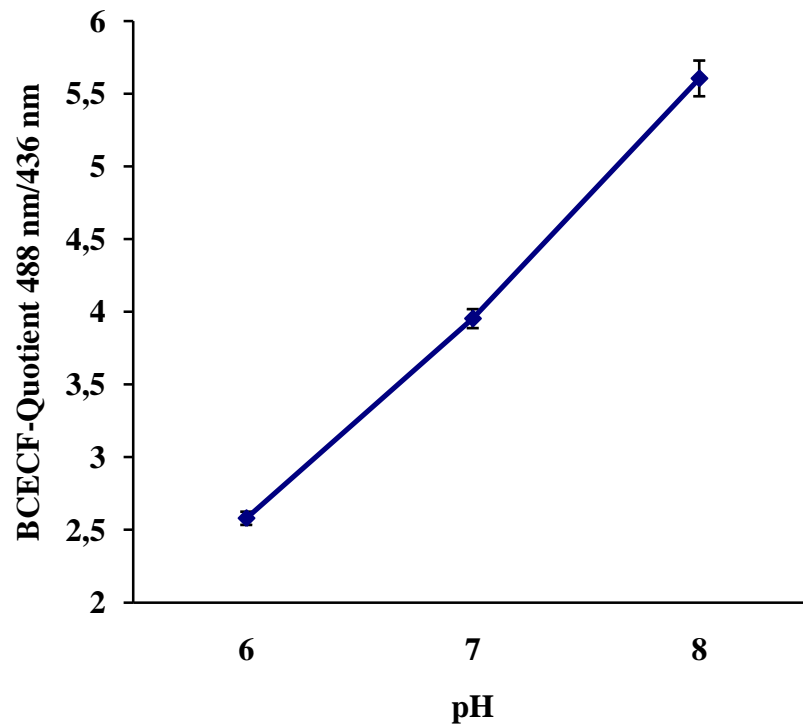


Abbildung 6: Die Eichung des Fluoreszenzsignals. Mit Hilfe des H^+/K^+ -Austauschers Nigericin wurde der intrazelluläre pH den pH-Werten der extrazellulären Lösungen angeglichen. So ließ sich der BCECF-Quotient in pH-Werte umrechnen.

Aus dieser Eichkurve wurde die Gleichung

$$pH = ((BCECF-Quotient)+6,4)/1,5$$

zur Umrechnung des BCECF-Quotienten in pH-Einheiten ermittelt.

2.2.7 Applikation von CO₂

Alle Messungen zur Bestimmung der Schlagfrequenz sowie alle Messungen des intrazellulären pH-Werts wurden in einer temperierbaren Kammer (Mikroskop Inkubator System Tokai Hit, Spectra Services, Ontario) bei 37°C durchgeführt (Abbildung 7).

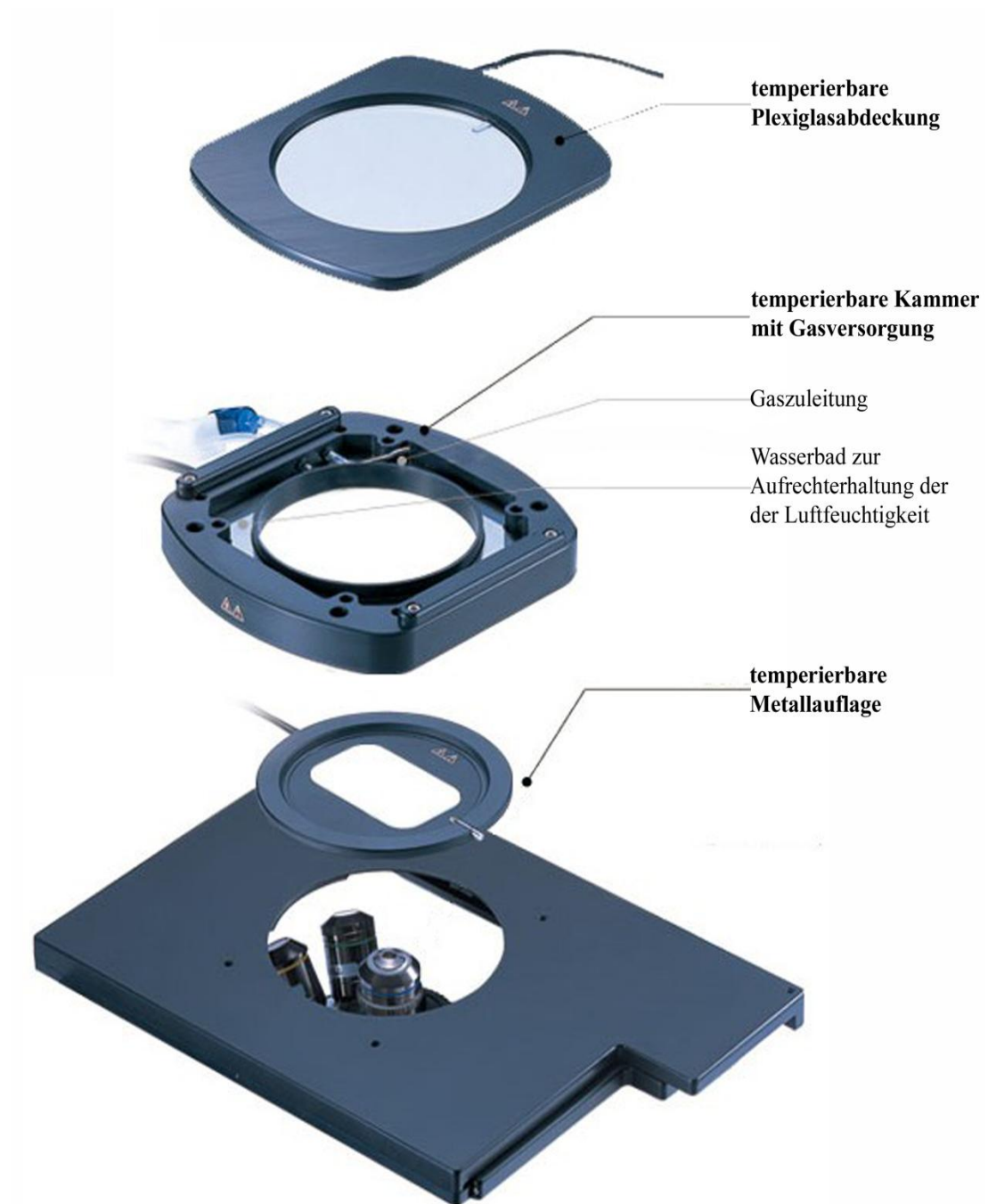


Abbildung 7: Die Applikation von CO₂ erfolgte über die Gaszuleitung der temperierbaren Kammer (Mikroskop Inkubator System Tokai Hit). (modifizierte Abbildung: www.spectraservices.com)

Die Probe wird hierbei von einem Wasserbad umgeben, wodurch die Aufrechterhaltung der Luftfeuchtigkeit in der Kammer garantiert wird. Die Applikation von CO₂ erfolgt hierbei über die, im Wasserbad befindliche, Gaszuleitung.

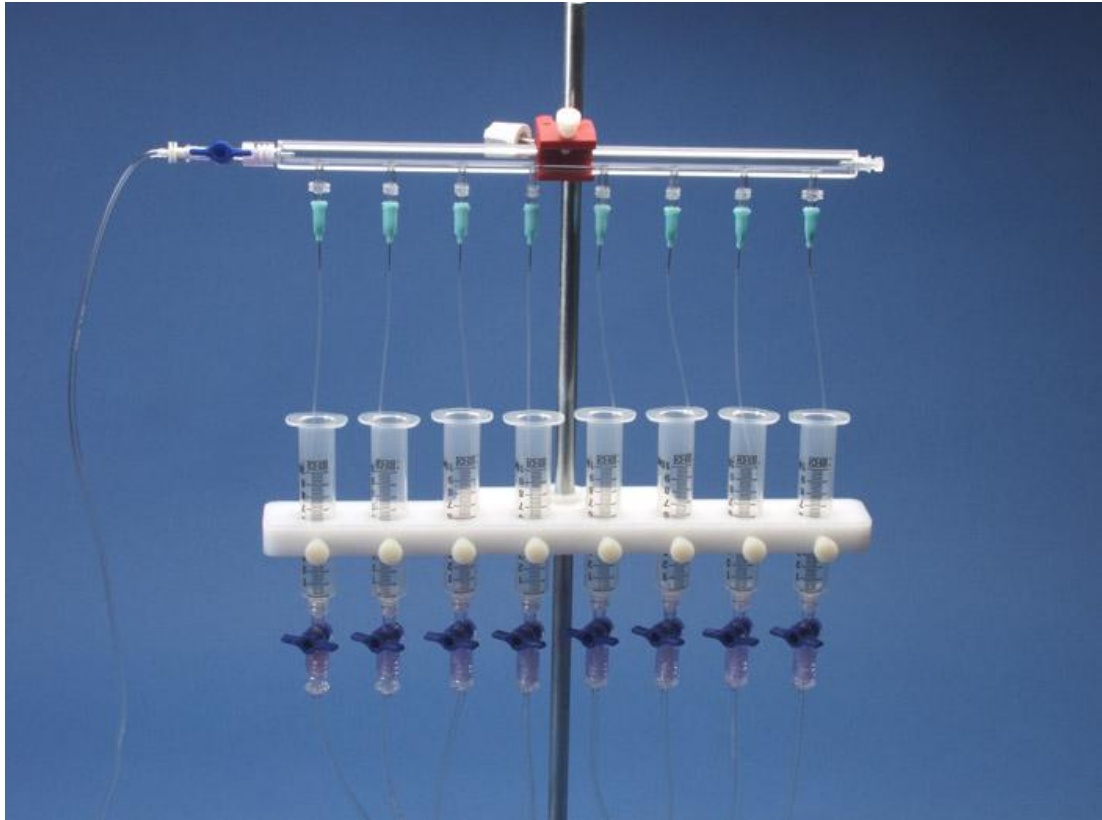


Abbildung 8: Zur Anreicherung der verschiedenen Puffer mit CO₂ wurde der Gas Bubbler (GBM10, Warner Instruments, Hamden) verwendet. (Abbildung: www.warneronline.com)

Alle, während der Applikation von CO₂ zugeleiteten Puffer wurden mit Hilfe des Gas Bubbler (GBM10, Warner Instruments, Hamden) mit CO₂ angereichert (Abbildung 8).

2.2.8 Nachweis der enzymatischen Carboanhydraseaktivität

Die Messung der enzymatischen Aktivität von Carboanhydrasen erfolgte im zoologischen Institut der Universität Kaiserslautern in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Joachim W. Deitmer durchgeführt. Die Carboanhydraseaktivität wurde durch Darstellung des ^{18}O Verlusts von doppelt markiertem $^{13}\text{C}^{18}\text{O}_2$ nach mehreren Hydratisierungs und Dehydratisierungsschritten von CO_2 und HCO_3^- bei 25°C ermittelt. Der Verlust von ^{18}O von $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ ($m/z = 49$) über Bildung des Intermediärprodukts $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ ($m/z = 47$) und des Endprodukts $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ ($m/z = 45$) wurde mit Hilfe eines Quadrapole Massenspektrometers (MSD 5970; Hewlett Packard, Waldbronn) sichtbar gemacht. Die relative ^{18}O Anreicherung wurde durch die gemessenen Isotopenhäufigkeiten (45, 47, 49) über die Zeit mit Hilfe folgender Formel berechnet: $\log_{\text{Anreicherung}} = \log(49 \times 100 / (49 + 47 + 45))$. Die lineare Steigung des Logarithmus der Anreicherung über die Zeit, welche durch den Verlauf der ^{18}O -Degradation repräsentiert, wurde mit Hilfe der Analyse-Software OriginPro v7.0 (OriginLab, Northampton, MA) ermittelt. Zur Berechnung der Carboanhydraseaktivität wurde der Verlauf der ^{18}O -Degradation der katalysierten Reaktion mit dem der unkatalysierten Reaktion verglichen. Die Berechnung der Enzymaktivität in Units erfolgte nach der Definition von Badger und Price (*Badger and Price 1989*). Der Definition zufolge werden 100% Stimulation der unkatalysierten ^{18}O Degradation von doppelt markiertem $^{13}\text{C}^{18}\text{O}_2$ als 1 unit deklariert. Zur Durchführung des Experiments

wurde eine Küvette mit 8 ml HS-Puffer gefüllt und mit 8 µl „schwerem“ Wasser und dem darin befindlichen doppelt markierten $^{13}\text{C}^{18}\text{O}_2$ versetzt. Nach 4 Minuten erfolgte die Zugabe von 4×10^6 Spermien, was je nach Zellkonzentration einer Menge von 100-200 µl Spermiesuspension entsprach. Daraufhin wurde der Verlauf der ^{18}O -Degradation gemessen. Bei der Benutzung des Carboanhydraseinhibitors Ethoxyzolamid wurde dieser während der Messung in der jeweiligen Konzentration 6 Minuten nach Zugabe der Spermien zugegeben.

2.2.9 Spermienausstriche

Zur Durchführung einer immunzytochemischen Nachweisreaktion müssen Spermien auf einem Objektträger fixiert werden. Nach dem Waschen der Spermien werden 10 µl der Spermiesuspension zur Kontrolle der Motilität und Zelldichte auf einen Objektträger pipettiert. Im Anschluss wird die Suspension mit HS-Puffer zu einer Endkonzentration von etwa 4×10^5 Zellen/ml verdünnt, sodass die Spermien bei mikroskopischer Betrachtung einzeln zu liegen kommen. Die eingesetzte Verdünnung variiert je nach Spermienausbeute und kann daher nicht im Voraus festgelegt werden. Im Anschluss werden 20 µl der Spermiesuspension auf den Objektträger getropft und 30 min waagerecht bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Nach 15 minütiger Fixierung in Methanol bei Raumtemperatur werden die

Objektträger nochmals bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die fertigen Spermienausstriche können bis zu 2 Wochen bei 4°C gelagert werden.

2.2.10 Immunzytologie

Zum Nachweis der Lokalisation von Proteinen im Spermium wurde eine DAB-Markierung mit Biotin-Avidin-Verstärkung durchgeführt. Die Methode wird als indirekte Methode bezeichnet, da der biotinylierte Sekundärantikörper an einen unkonjugierten antigenspezifischen Primärantikörper bindet, wodurch eine hohe Sensitivität gewährleistet wird. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper wird ein Avidin-Enzymkonjugat zugegeben, welches an den biotinylierten Sekundärantikörper bindet. Das in diesem Fall verwendete, zunächst farblose Chromogen DAB wird durch die angekoppelte Peroxidase (HRP) unter Bildung von Wasserstoff zu einem braunen Endprodukt oxidiert. Als Substrat für die Farbreaktion dient Wasserstoffperoxid. In Abbildung 9 ist das Prinzip der Biotin-Avidin-Methode dargestellt. Die vorbereiteten Spermienausstriche werden zunächst in PBS gewaschen. Um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden, werden alle nachfolgenden Schritte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zunächst erfolgt das Vorblocken der endogenen Peroxidase mit Glucoseoxidase in PBS-Glucose-Puffer für 45 min bei 37°C. Über Nacht erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper (Polyklonaler Hase anti-Mensch SLC4A4 (NBC1)-

Antikörper, 1:200 in PBS mit 5% BSA) bei 4°C, wobei Avidin (1:300) zur Bindung von endogenem Biotin zugesetzt wird. Nach Entfernung von überschüssigem Primärantikörper durch drei Waschschrte in PBS für je 5 min erfolgt die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Biotinylierter Ziege anti-Hase IgG-Antikörper, 1:200 in PBS mit 5% BSA) für 30 min bei Raumtemperatur. Zur Absättigung von überschüssigem Avidin enthält der Ansatz zusätzlich Biotin (1:50).

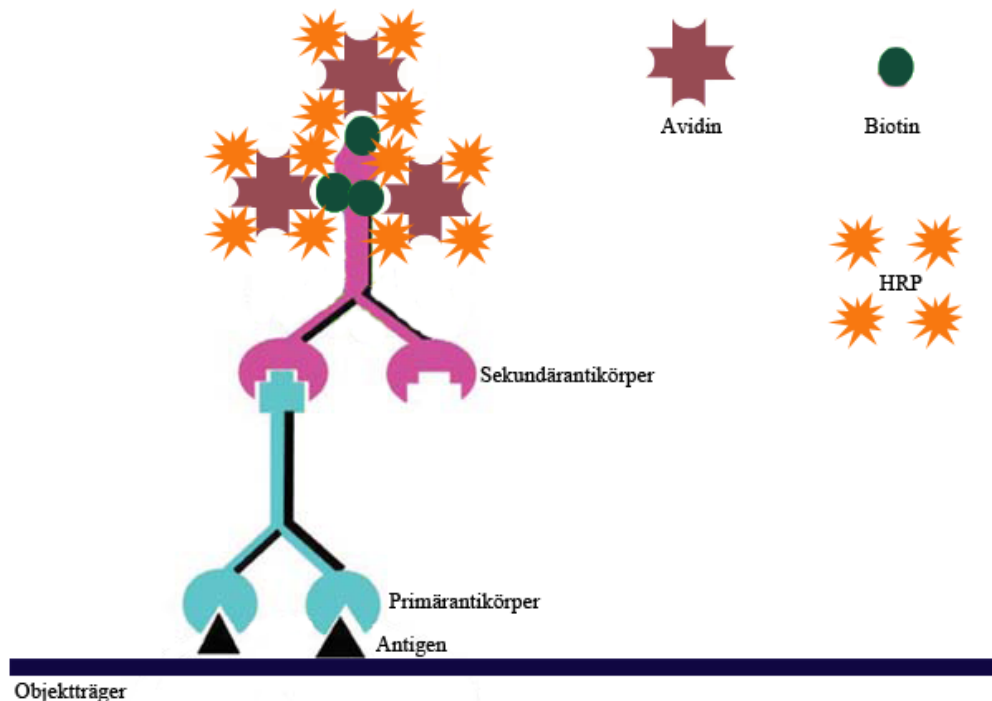


Abbildung 9: Schematische Darstellung der immuncytochemischen Biotin-Avidin-Methode. Ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet an den antigenspezifischen Primärantikörper. Die hohe Affinität von Avidin zu Biotin gewährleistet die Bindung des Avidin-Enzymkonjugats an den Sekundärantikörper. Die angekoppelte Peroxidase (HRP) katalysiert die Farbreaktion des DAB und somit der Detektion des Signals.

Darauf folgen drei Waschschr tte in PBS für je 5 min. Zur Ankopplung der Peroxidase an den biotinylierten Sekundärantikörper erfolgt eine 30-minütliche Inkubation mit Vectastain[®]-Lösung bei Raumtemperatur. Diese beinhaltet das Avidin-Peroxidase-Konjugat und wird bereits 30 min vor Gebrauch bei Raumtemperatur angesetzt. Die folgenden Arbeitsschritte werden unter dem Abzug durchgeführt. Die Vectastain-Lösung wird mit TBS abgespült, sodass ein Tropfen TBS auf dem Präparat verbleibt, um Austrocknung zu vermeiden. Es folgt die Zugabe von ein bis zwei Tropfen vorbereiteter DAB-Lösung, wodurch die Farbreaktion initiiert wird. Die Reaktion wird unter einem Mikroskop verfolgt und wird bei ausreichendem Signal durch Zugabe von Aqua dest. abgestoppt. Die Reaktionszeit variiert je nach Antikörper zwischen wenigen Sekunden und wenigen Minuten. Anschließend wird das Präparat für 5 min in PBS gewaschen, bevor die Kernfärbung mittels Hämatoxylin nach Ehrlich erfolgt. Hierbei findet eine Chelatbildung durch Hämatein (oxidiertes Hämatoxylin) in Gegenwart mehrwertiger Kationen statt, wodurch es zur Entstehung typischer dunkelblauer Farbkomplexe kommt. Nach einem kurzen Waschschr tt in Aqua dest. erfolgt eine einmin tliche Inkubation in Hämalaun. Daraufhin erfolgt ein Waschschr tt in Aqua dest. für 40 sek, gefolgt von einer 5 minütigen Inkubation in Leitungswasser, was aufgrund der darin enthaltenen mehrwertigen Kationen zur Farbreaktion führt. Das Eindecken der Präparate erfolgt mit Depex, einer hydrophoben Verbindung. Daher wird das Präparat im Anschluss wie folgt entwässert: 3 min in 70% Propanol, 3 min in 80% Propanol, 3 min in 90%

Propanol, 3 min in 100% Propanol, 3 x 5 min in Xylol. Die Analyse des Präparats am Lichtmikroskop kann erfolgen, sobald das Eindeckmedium getrocknet ist.

2.2.11 Proteinextraktion

Zur Herstellung eines Proteinextrakts aus Spermien wurde die bei der Spermienpräparation gewonnene Spermiesuspension zunächst 5 min bei 13000 x g und 4°C abzentrifugiert. Nach Entfernung des HS-Puffers wurde das Spermienpellet in 100 µl kaltem Homogenisierungspuffer resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Proben alle 5 min durchmischt. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 13000 x g und 4°C. Der Überstand mit den darin enthaltenen Spermienproteinen wurde anschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.2.12 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung des Proteingehalts eines Proteinextrakts wird das BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. Bei der BCA-Methode werden zweiwertige Kupferionen in Anwesenheit von Proteinen zu einwertigen Kupferionen reduziert, welche mit Bicinchoninsäure einen

violetten Farbkomplex bilden. Die Menge an Proteinen korreliert mit der Reduktion zweiwertiger Kupferionen, sodass durch Messung der Absorption bei 562 nm die Proteinkonzentration bestimmt werden kann. Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurden zunächst je 12,5 µl der verschiedenen BSA-Standards in den Konzentrationen 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg/ml, sowie 12,5 µl H₂O als Leerwert (Blanc) in Eppendorgefäßen vorgelegt. Dazu wurden je 15 µl des Lösungsmittels der Proben (Homogenisierungspuffer) gegeben. Die Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit H₂O verdünnt, indem je 2,5 µl der jeweiligen Probe mit 25 µl H₂O dest. verdünnt wurden. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 200 µl BCA-Reagenz gegeben, wonach eine Inkubation für 30 min bei 37°C erfolgte. Die Absorption wurde bei 562 nm mit einem Photometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) gemessen, welches die Proteinkonzentration anhand der errechneten Eichkurve aus den Messungen der Standard-Proteinlösungen bestimmt.

2.2.13 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Unter Elektrophorese versteht man generell die Wanderung von positiv oder negativ geladenen Molekülen im elektrischen Feld, in einer Lösung oder einer Trägermatrix. Unterwirft man eine Mischung von Proteinen einer Elektrophorese, wandern die verschiedenen Proteine in schmalen Banden mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, da diese von der Molekülgröße und

der Anzahl überschüssiger positiver beziehungsweise negativer Ladungen auf der Moleküloberfläche abhängt. Besteht die Trägermatrix aus einem Gel (Stärke, Agarose oder Polyacryl), so spricht man von Gelelektrophorese. Die Wanderung von Makromolekülen wird zusätzlich von der Struktur des Gels beeinflusst.

Polyacrylamidgele entstehen durch die Polymerisation von Acrylamid und der Vernetzung der linearen Polymere durch N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid wird durch Ammoniumperoxodisulfat (APS), welches leicht Radikale bildet, initiiert. Als Katalysator dient dabei N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Die Acrylamidkonzentration im Polymerisationsansatz bestimmt die Länge der Polyacrylamidketten, die Bisacrylamidkonzentration den Vernetzungsgrad. Beide zusammen bestimmen Porengröße, Elastizität und Dichte des Gels. Je nach Größe der zu trennenden Moleküle verwendet man Gele unterschiedlicher Porösität. Die Gelelektrophorese dient somit der Analyse von Makromolekülen und ermöglicht eine schnelle Bestimmung des Molekulargewichts. Bei der SDS-Gelelektrophorese verbinden sich die meisten Proteine mit SDS (Sodiumdodecylsulfat) zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Masse zu Ladungsverhältnis. SDS denaturiert die Proteine, besonders nach vorheriger Reduktion mit β -Mercaptoethanol oder DTT (Dithiothreitol), so dass sie ihre spezifische Quartär-, Tertiär- und zum Teil auch ihre Sekundärstruktur verlieren und eine

mehr oder weniger einheitliche Form annehmen. Während der Elektrophorese wandert der SDS- Protein- Komplex im elektrischen Feld zur Anode. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt der Polyacrylmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stokes-Radius und somit nach ihrem Molekulargewicht auf. Es ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der elektrophoretischen Mobilität des Polypeptids im Bereich von 10 bis 1000 kDa, je nach Konzentration des Trenngels. Zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen werden neben den zu untersuchenden Proteinen Markerproteine mit bekanntem Molekulargewicht aufgetrennt.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurden fertig gegossene 4-12% Bis-Tris-Gele in Kombination mit der X Cell Sure Lock Electrophoresis Cell (Invitrogen, Carlsbad Calif., USA) verwendet.

Durchführung der SDS-PAGE:

Für den Gellauf wurde 1 x MES-Laufpuffer verwendet. Zur Inaktivierung vorhandener Proteasen sowie zur Zerstörung der Quartär-, Tertiär- und zum Teil auch Sekundärstruktur der Proteine wurden die auf Eis gelagerten Proteinproben nach der Zugabe von 5% β -Mercaptoethanol 5 min bei 95° C gekocht. Je nach Versuch wurden 20 bis 30 μ g Protein eingesetzt. Parallel zu den Proben wurde ein Proteinmarker, welcher vorgefärbte Proteine bekannter Größe enthält, aufgetragen (Kaleidoscope Prestained Standards,

BIO-RAD, München). Die Elektrophorese wurde bei 200 V und 120 mA für eine Dauer von 40 min durchgeführt.

2.2.14 Western-Blot

Der Western-Blot oder Immunoblot stellt eine sehr sensitive und spezifische Methode zum Proteinnachweis dar. Diese verbindet die hohe Trennschärfe der Gelelektrophorese mit der Spezifität der Antikörpererkennung und der Empfindlichkeit von Enzymtests. Die in der SDS-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennten Proteine werden beim Western-Blot durch ein senkrecht zum SDS-Gel gerichtetes elektrisches Feld auf eine Trägermembran übertragen (geblottet). Die Proteine gehen hydrophobe Wechselwirkungen mit der beschichteten Membran ein und werden so auf dieser immobilisiert. Hierbei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Aktivität und Reaktivität der Proteine bleiben bei diesem Verfahren weitgehend erhalten, somit können diese sowohl quantitativ als auch qualitativ mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgt der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine proteinbindende Nitrocellulose-Membran durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Hierzu spannt man das Gel und die Membran zusammen mit Filterpapier und Schwämmen so in die „Sandwich-Mappe“ (X Cell II Blot Module, Invitrogen, Carlsbad Calif., USA) ein, wie es in Abbildung 10 dargestellt wird.

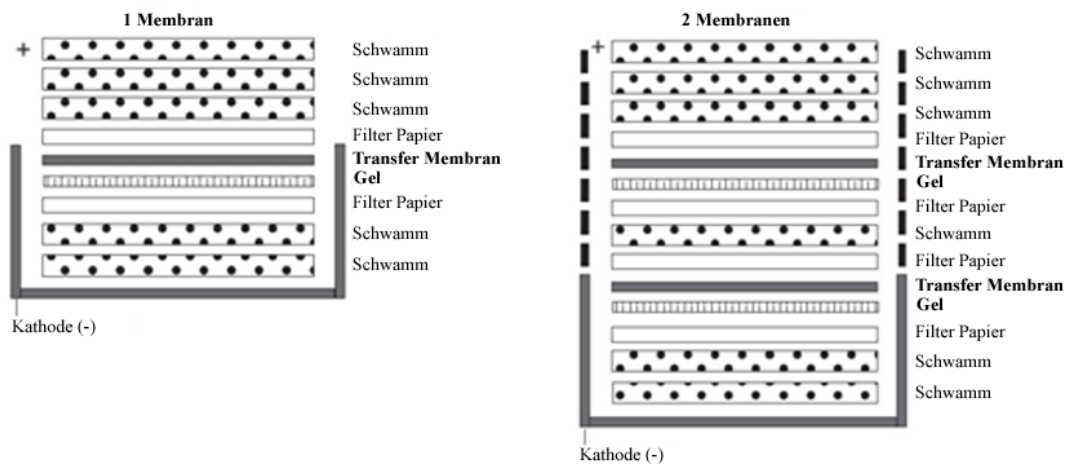


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Western Blots nach dem Wet Tank-Verfahren von Invitrogen. In A ist der Aufbau eines Western Blots mit einem Gel und einer Nitrozellulosemembran dargestellt, während B den Aufbau mit zwei Gelen und zwei Nitrozellulosemembranen zeigt. (Abbildung: commerce.invitrogen.com)

2.2.15 Proteinfärbung mit Ponceau-S

Zur Überprüfung der vollständigen Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran sowie der Gleichmäßigkeit der aufgetragenen Proteinmengen wird die Membran nach dem Blotten mit Ponceau Rot-Lösung (Merck, Darmstadt) gefärbt. Hierzu wird die Membran etwa 5 min in der Gebrauchslösung inkubiert. Anschließend die Entfärbung der Membran in 1 x TBST.

2.2.16 Antikörperdetektion

Nach der Entfärbung wird die Membran in Blocking Solution (10% RotiBlock in TBS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch die Bindung von Antikörpern an unspezifische Bindungsstellen verhindert wird. Anschließend erfolgt die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper (Polyklonaler Kaninchen anti-Mensch SLC4A4 (NBC1)-Antikörper, 1:500 in TBS mit 10% RotiBlock). Ungebundene Primärantikörper wurden daraufhin durch Waschen der Membran entfernt, bevor die Membran mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP-Antikörper, 1:10000 in TBS mit 10% RotiBlock) inkubiert wurde. Auch hier wurden ungebundene Antikörper nach der entsprechenden Inkubationszeit durch Waschen entfernt. Der auf der Membran entstandene Komplex aus Protein, Primärantikörper und Sekundärantikörper wurde daraufhin unter Verwendung des Ecl-Systems (Amersham biosciences, Buckinghamshire, UK) detektiert. Dazu wurde zunächst die getrocknete Membran 3 min mit 1 ml EclPlus[®]-Gebrauchslösung inkubiert. Dieses enthält unter anderem Luminol, welches in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid durch Peroxidase oxidiert wird, wodurch Chemilumineszenz entsteht. Die durch die Peroxidase katalysierte Chemilumineszenz wird im Anschluss entweder durch Auflegen eines Röntgenfilmes oder mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (Chemi Doc XRS+, BIO-RAD, München) ausgewertet.

Zusammensetzung der ECL-Gebrauchslösung:

1ml Lösung 1; 1ml Lösung 2

Die einzelnen Lösungen werden bei 4° C gelagert und erst kurz vor Gebrauch vermischt.

2.2.17 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n Beobachtungen angegeben. Es galt:

$$SEM = \frac{\sigma_{(n-1)}}{\sqrt{n}}$$

mit $\sigma_{(n-1)}$ als Standardabweichung der Stichprobe. Wirkungen von Hemmstoffen und Lösungen wurden in ungepaarter Form, d.h. an unterschiedlichen Spermien, untersucht. Zur Prüfung der Signifikanz wurde daher der ungepaarte Student t -Test verwendet, welcher mit Hilfe der Statistik-Software PASW Statistics 18 (SPSS GmbH, München) durchgeführt wurde. In den gezeigten Abbildungen ist ein Signifikanzniveau mit einem p -Wert von $\leq 0,05$ mit * markiert, $p \leq 0,01$ mit **, und $p \leq 0,001$ mit ***.

3 Ergebnisse:

3.1 Sowohl HCO_3^- als auch CO_2 führen zur Erhöhung der Schlagfrequenz von Spermien

Es wurde bereits gezeigt, dass HCO_3^- die Fähigkeit zur Erhöhung der Schlagfrequenz von Spermien besitzt (*Wennemuth, Carlson et al. 2003*). Um zu untersuchen, ob die Erhöhung der Schlagfrequenz auch durch CO_2 induzierbar ist, wurden Schlagfrequenzanalysen an Spermien durchgeführt, welche mit HCO_3^- oder mit CO_2 behandelt wurden. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Messung dargestellt.

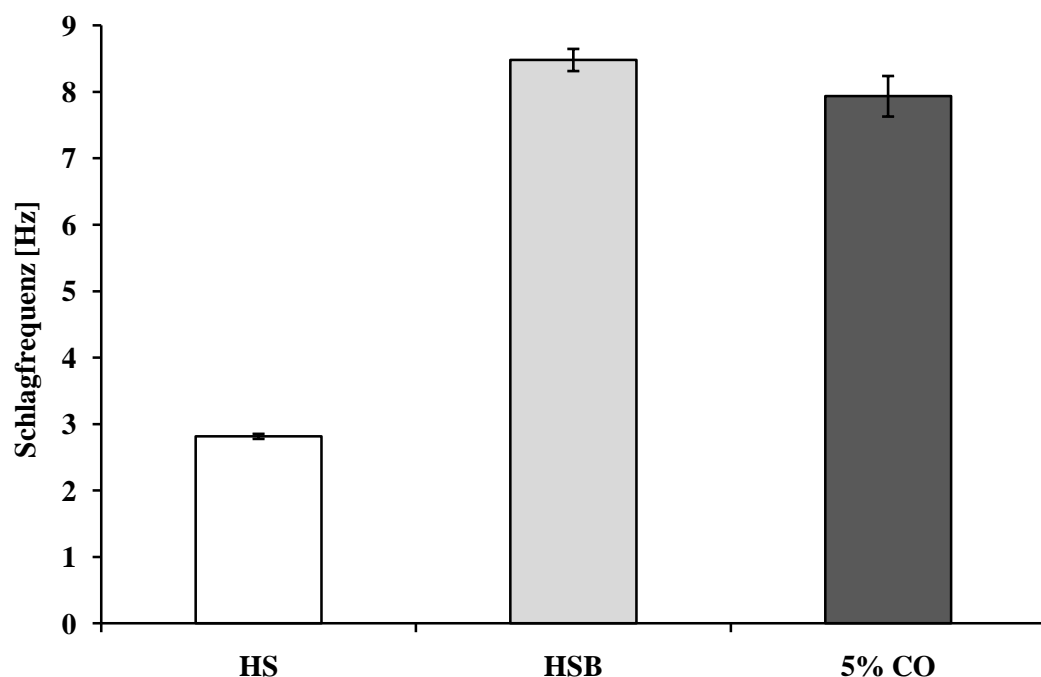


Abbildung 11: Murine Spermien reagieren sowohl auf Bikarbonat (grauer Balken) als auch auf CO_2 (schwarzer Balken) mit einer Erhöhung der Schlagfrequenz. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten ($n=10$) \pm Standardfehler.

Die Messung der Schlagfrequenz von Spermien in HS-Puffer als Kontrolle ergab einen Wert von $2,82 \pm 0,04$ Hz. Nach 2-minütiger Inkubation der Spermien in HS-Puffer, welcher HCO_3^- in einer Endkonzentration von 15 mM enthielt, erreichten die Spermien eine Schlagfrequenz von $8,48 \pm 0,17$ Hz. Die 8-minütige Begasung der Spermien mit 5% CO_2 führte zu einer vergleichbaren Erhöhung der Schlagfrequenz auf einen Wert von $7,94 \pm 0,31$ Hz.

Um den Einfluss verschiedener CO_2 Konzentrationen auf die Erhöhung der Schlagfrequenz zu untersuchen, wurden Spermien für 10 Minuten sowohl mit 2% CO_2 als auch mit 5% CO_2 begast (Abbildung 12A). Sowohl 2 Minuten vor der Applikation von CO_2 als auch während der Applikation wurden im Abstand von 2 Minuten Bildstapel aufgenommen um die Änderung der Schlagfrequenz in Abhängigkeit der Zeit zu ermitteln. Nach Beendigung der Applikation von CO_2 wurden im Abstand von drei Minuten vier weitere Bildstapel zur Bestimmung der Schlagfrequenz aufgenommen. Die Applikation von 5% CO_2 resultierte in einer Steigerung der Schlagfrequenz von $2,90 \pm 0,14$ Hz auf einen nahezu maximalen Wert von $8,37 \pm 0,58$ Hz innerhalb von 6 Minuten, wohingegen im Falle von 2% CO_2 10 Minuten erforderlich waren, um die Frequenz von $2,89 \pm 0,27$ Hz auf einen Maximalwert von $6,96 \pm 0,69$ Hz zu steigern. Zwölf Minuten nachdem die Applikation von 2% CO_2 gestoppt wurde, fiel die Schlagfrequenz nahezu auf ihren Ausgangswert zurück ($3,32 \pm 0,28$ Hz).

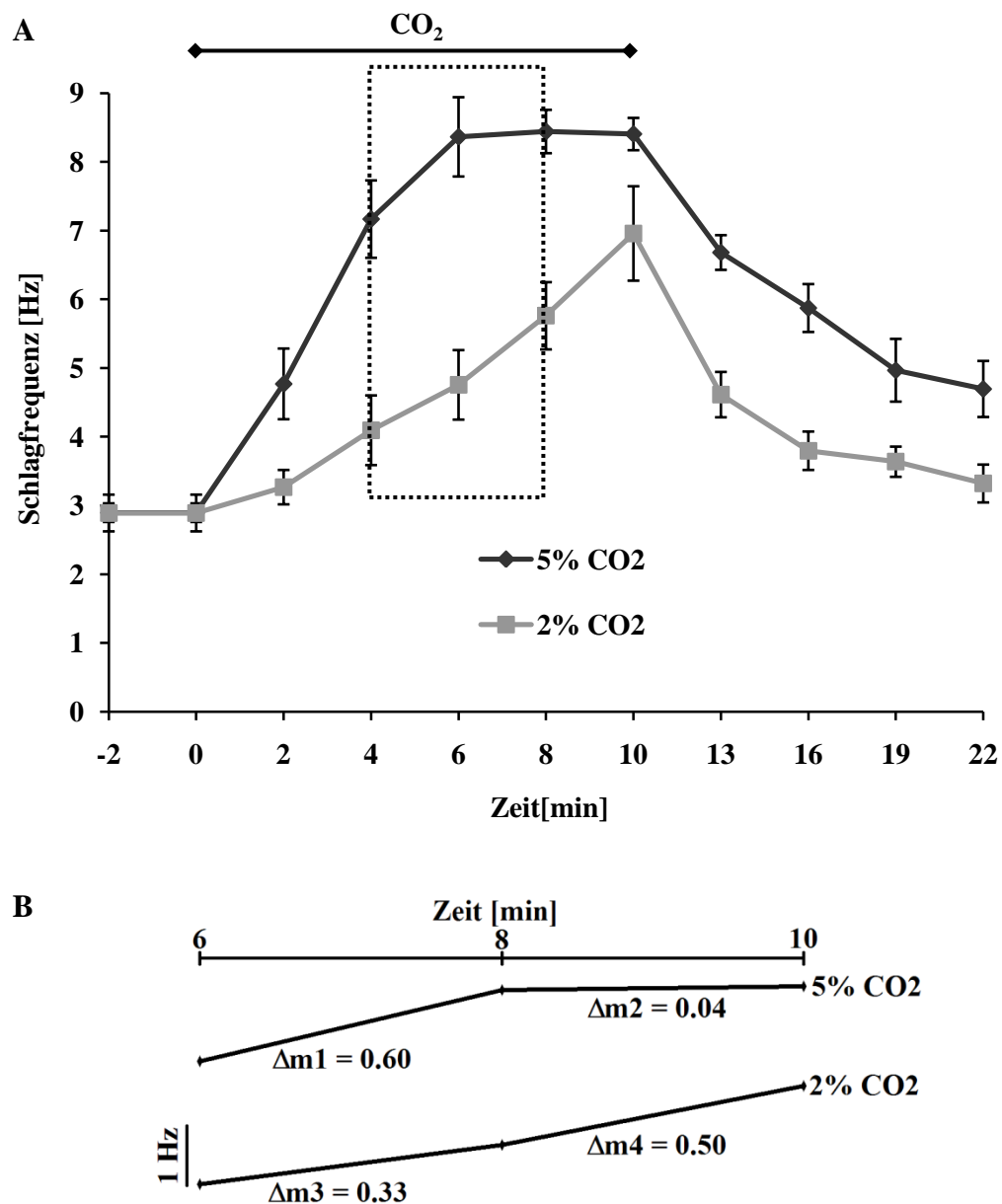


Abbildung 12: Der Einfluss verschiedener CO₂ Konzentrationen auf die Schlagfrequenz von Spermien in Abhängigkeit der Zeit. A: Bei Applikation von 2% CO₂ (graue Linie) benötigen Spermien 4 Minuten länger um ihre Schlagfrequenz auf einen maximalen Wert zu steigern als bei Applikation von 5% CO₂ (schwarze Linie). Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 Experimenten (n=10) ± Standardfehler. B: Die Änderungen der Schlagfrequenz in Abhängigkeit der Zeit wurden durch Ermittlung der Geradensteigungen aus dem in A markierten Rechteck erfasst.

Im Falle der Applikation von 5% CO₂ benötigten die Spermien länger als 12 Minuten, um den Ausgangswert der Schlagfrequenz zu erreichen. 12 Minuten nachdem die CO₂-Zufuhr gestoppt wurde fiel die Frequenz lediglich auf einen Wert von $4,70 \pm 0,41$ Hz zurück. Zur Erfassung der Änderung der Schlagfrequenzen in Abhängigkeit der Zeit wurden die Geradensteigungen der Zeitintervalle zwischen der sechsten und zehnten Minute ermittelt, welche in Abbildung 12B dargestellt sind. Demnach vermindert sich die Steigung der Schlagfrequenz 6 Minuten nach Beginn der Begasung mit 5% CO₂ von 0,60 Hz/min (Δm_1) auf 0,04 Hz/min (Δm_2), während im Falle der Applikation von 2% CO₂ eine Erhöhung der Steigung von 0,33 Hz/min (Δm_3) auf 0,50 Hz/min (Δm_4) zu messen war. Außerdem wurde durch Begasung der Spermien mit N₂ die Auswirkung CO₂-freier Atmosphäre auf die Schlagfrequenz untersucht. Hierbei konnte allerdings kein Unterschied in der Schlagfrequenz im Vergleich zu atmosphärischen CO₂ Konzentrationen (0,03 bis 0,036%) festgestellt werden (n=5, Daten nicht gezeigt).

Im folgenden Versuch sollte überprüft werden, ob Carboanhydrasen an der CO₂-induzierten Erhöhung der Schlagfrequenz beteiligt sind. Hierzu wurden Spermien erneut für 10 Minuten mit 5% CO₂ begast, wobei diese bereits 5 Minuten vor Beginn der CO₂-Applikation in HS-Puffer inkubiert wurden, welcher den Carboanhydrase-Inhibitor Ethoxyzolamid (EZA) in einer Endkonzentration von 500 nM enthielt (Abbildung 13A).

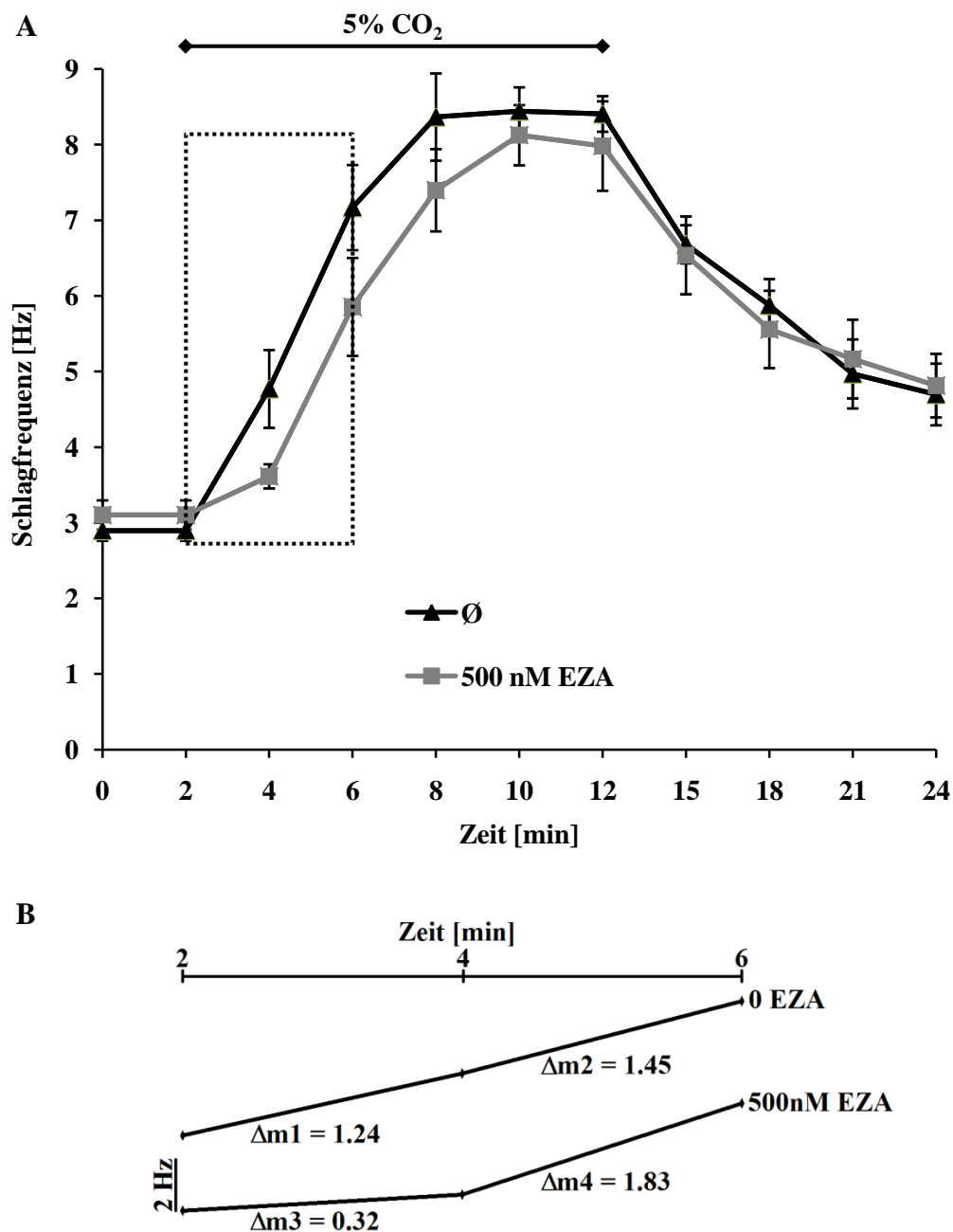


Abbildung 13: Die Applikation des Carboanhydrase-Inhibitors Ethoxyzolamid (EZA) verlangsamt die CO₂-bedingte Erhöhung der Schlagfrequenz. A: Nach Applikation von 5% CO₂ benötigen Spermien in Anwesenheit von EZA (graue Linie) 2 Minuten länger um ihre Schlagfrequenz auf einen maximalen Wert zu steigern als in Abwesenheit von EZA (schwarze Linie). Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten (n=10) ± Standardfehler. B: Die Änderungen der Schlagfrequenz in Abhängigkeit der Zeit wurden durch Ermittlung der Geradensteigungen aus dem in A markierten Rechteck erfasst.

Um die Änderung der Schlagfrequenz in Abhängigkeit der Zeit der CO₂-Applikation zu ermitteln, wurde alle 2 Minuten ein Bildstapel aufgenommen und die Schlagfrequenz bestimmt. In Abwesenheit von EZA resultierte die Applikation von 5% CO₂ innerhalb von 6 Minuten in einer Steigerung der Schlagfrequenz von $2,90 \pm 0,14$ Hz auf $8,37 \pm 0,58$ Hz, wohingegen in Anwesenheit von EZA 8 Minuten erforderlich waren, um die Frequenz von $3,10 \pm 0,10$ Hz auf $8,13 \pm 0,40$ Hz zu steigern. Die Änderung der Schlagfrequenzen in Abhängigkeit der Zeit zwischen dem Beginn der CO₂-Applikation und der vierten Minute wurde durch Bestimmung der Geradensteigungen der Zeitintervalle ermittelt, welche in Abbildung 13B dargestellt sind. In Abwesenheit von EZA erhöht sich die Steigung der Schlagfrequenz 2 Minuten nach Beginn der Begasung mit 5% CO₂ von 1,24 Hz/min (Δm_1) auf 1,45 Hz/min (Δm_2), während in Anwesenheit von EZA eine Erhöhung der Steigung von 0,32 Hz/min (Δm_3) auf 1,83 Hz/min (Δm_4) auftrat.

3.2 Gesamtaktivitätsbestimmung von Carboanhydrasen in Spermien und deren Rolle bei der Modulation der CO₂-bedingten intrazellulären Ansäuerung

Um zu untersuchen in welchem Ausmaß Carboanhydrasen in Spermien enzymatisch aktiv sind, wurde die Gesamtcarboanhydraseaktivität in Spermien in Anwesenheit und Abwesenheit verschiedener EZA-

Konzentrationen mit Hilfe eines Massenspektrometers bestimmt. Die enzymatische Aktivität von jeweils $\sim 4 \times 10^6$ Spermien wurde sowohl vor als auch nach der Applikation von EZA gemessen (Abbildung 14).

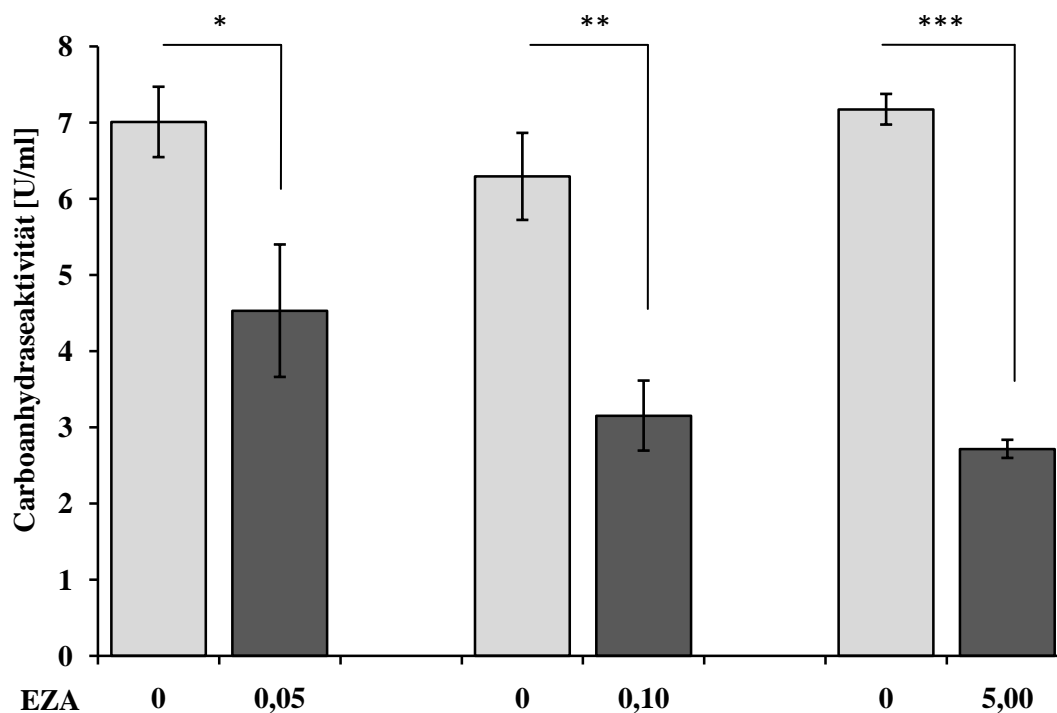


Abbildung 14: Auswirkung verschiedener Ethoxyzolamid-Konzentrationen auf die Gesamtcaboanhydraseaktivität von Spermien. Die Zugabe von EZA in einer Endkonzentration von 50 nM führt zur Verminderung der enzymatischen Aktivität um 35%, 100 nM EZA vermindert die Aktivität um 50%, während die Zugabe von 5 μ M EZA zu einer 62%-igen Verminderung der Aktivität führt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten ($n=6$) \pm Standardfehler.

Die Zugabe von 50 nM EZA resultierte in einer signifikanten Reduktion der enzymatischen Aktivität um 35% (von $7,01 \pm 0,46$ U/ml auf $4,53 \pm 0,87$ U/ml), 100 nM EZA verringerte die Aktivität um 50% (von $6,29 \pm 0,57$ U/ml auf

3,15±0,46 U/ml), während die Zugabe von 5 µM EZA in einer hoch signifikanten Reduktion der enzymatischen Aktivität um 62% (von 7,18±0,20 U/ml auf 2,72±0,12 U/ml) resultierte. In einem weiteren Versuch wurde der Effekt der beiden Carboanhydraseinhibitoren Ethoxzolamid (EZA) und Azetazolamid (AZA) auf die bikarbonat-induzierte Erhöhung der Schlagfrequenz untersucht. Hierzu wurden Spermien für 5 Minuten in normalem HS-Puffer sowie in HS-Puffer, welcher EZA oder AZA in der jeweiligen Endkonzentration enthielt, inkubiert. Parallel dazu wurden die Messungen in HS-Puffer durchgeführt, welcher HCO_3^- in einer Endkonzentration von 15 mM enthielt (HSB-Puffer). Im Anschluss an die 5-minütige Inkubation wurde zur Bestimmung der Schlagfrequenz ein Bildstapel aufgenommen. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 15 dargestellt. Durch Applikation von HCO_3^- erhöhte sich die Schlagfrequenz in Anwesenheit von 5 nM EZA von 2,63±0,15 Hz auf 5,71±0,23 Hz, während ohne die Behandlung mit EZA eine Beschleunigung der Frequenz von 2,84±0,28 Hz auf 7,60±0,28 Hz beobachtet wurde. Nach der Gabe von 500 nM EZA trat durch Stimulation mit HCO_3^- eine Erhöhung der Frequenz von 2,61±0,15 Hz auf 5,01±0,16 Hz auf. Durch Applikation von 100 µM EZA wurde mittels HCO_3^- nur noch eine 1.46-fache Erhöhung der Schlagfrequenz (von 2,92±0,24 Hz auf 4,26±0,21 Hz) beobachtet. Die Behandlung der Spermien mit AZA in gleicher Konzentration wie EZA hatte vergleichbare inhibitorische Effekte zur Folge. Die Schlagfrequenz wurde durch HCO_3^- in Anwesenheit von 5 nM AZA von 2,63±0,10 Hz auf 6,47±0,41 Hz erhöht, nach

Applikation von 500 nM AZA von $2,68 \pm 0,10$ Hz auf $5,83 \pm 0,34$ Hz, während nach Gabe von 100 μ M AZA nur noch eine Erhöhung der Frequenz von $3,01 \pm 0,25$ Hz auf $5,13 \pm 0,31$ Hz auftrat.

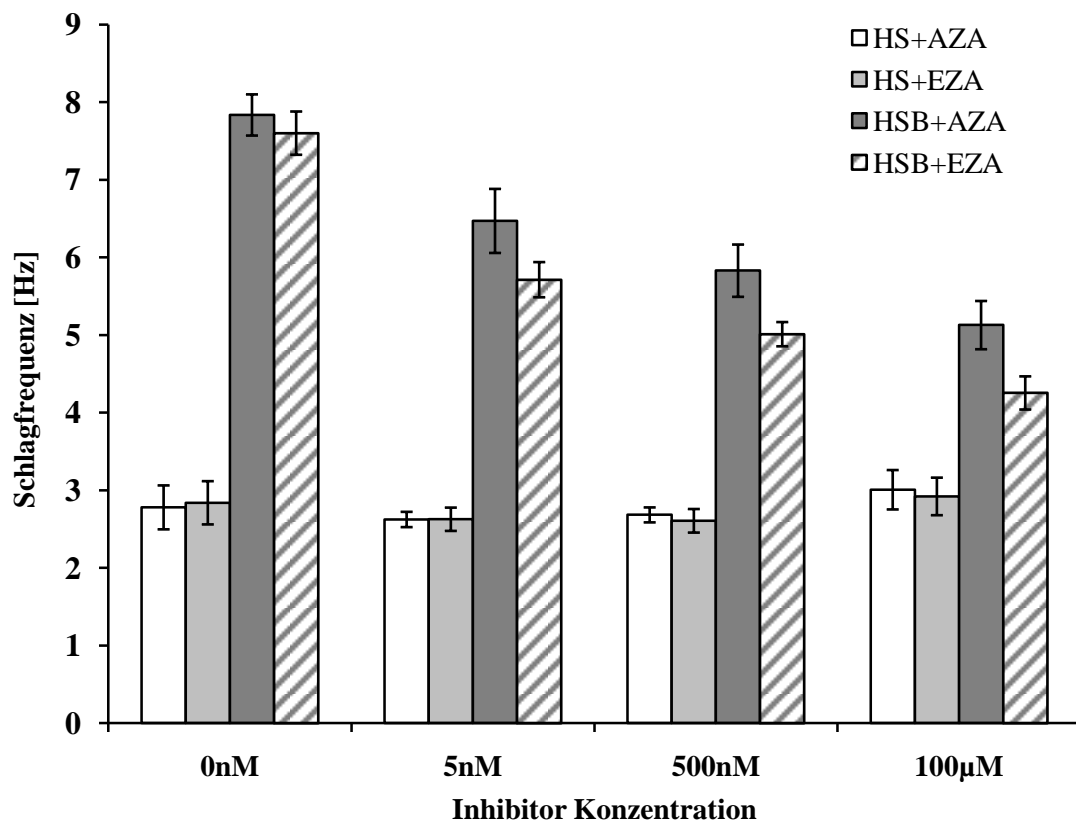


Abbildung 15: Die Applikation der Carboanhydrase-Inhibitoren Ethoxazolamid (EZA) und Azetazolamid (AZA) erniedrigt die HCO_3^- -bedingte Erhöhung der Schlagfrequenz (HS+EZA: hellgraue Balken; HSB+EZA: grau schraffierte Balken; HS+AZA: weiße Balken; HSB+AZA: dunkelgraue Balken). Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten ($n=10$) \pm Standardfehler.

An Erythrozyten wurde bereits gezeigt, dass die Applikation von CO_2 zur Verminderung des intrazellulären pH führt, wobei dies durch die Anwesenheit von Carboanhydrasen moduliert wird (*Blank and Ehmke 2003*), welche die

Reaktion von CO_2 und H_2O zu HCO_3^+ und H^+ katalysieren. Wie groß diese Bedeutung für Spermien ist, wurde überprüft indem Spermien sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von EZA in einer Endkonzentration von $10\ \mu\text{M}$ mit 2% CO_2 begast wurden. Zuvor wurden die Spermien zur Bestimmung des intrazellulären pH-Werts (pH_i) mit dem membrangängigen Azetoxymethylester (AM) des pH-sensitiven Fluorescein-Derivats 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF) beladen. Der Verlauf des intrazellulären pH-Werts wurde in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen und ist in Abbildung 16 dargestellt.

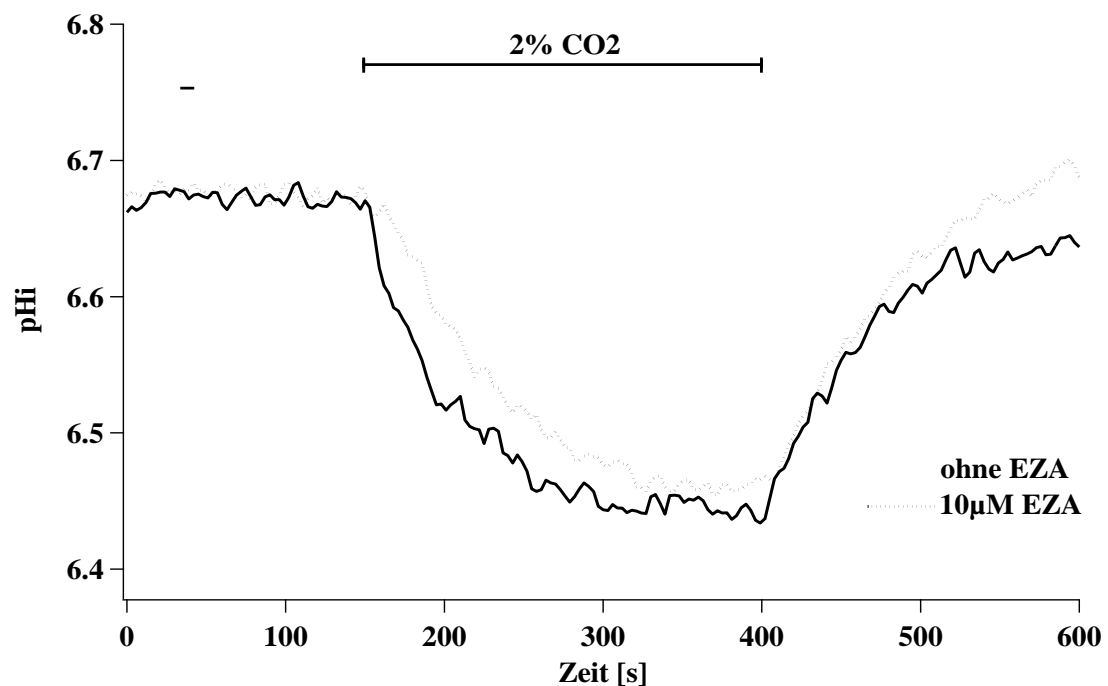


Abbildung 16: Ethoxyzolamid (EZA) verlangsamt die CO_2 -bedingte intrazelluläre Ansäuerung von Spermien. Die Änderung des intrazellulären pH-Werts (ΔpH_i) durch Stimulation mit 2% CO_2 betrug in Abwesenheit von EZA $-0,24 \pm 0,018$ (durchgezogene Linie), während in Anwesenheit von EZA eine pH-Wert-Änderung von $-0,21 \pm 0,020$ auftrat (gepunktete Linie). Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 Experimenten ($n=5$), wobei zugunsten der Übersichtlichkeit keine Standardfehler dargestellt sind.

Zunächst wurden die Spermien für 150 Sekunden mit HS-Puffer umspült. Im Anschluss erfolgte die Begasung mit 2% CO_2 für 250 Sekunden, wobei gleichzeitig mit CO_2 -gesättigtem HS-Puffer umspült wurde. Daraufhin wurden die Spermien erneut für 200 Sekunden mit normalem HS-Puffer umspült. In Abwesenheit von EZA betrug die Änderung des intrazellulären pH-Werts (ΔpH_i) durch Stimulation mit 2% CO_2 $-0,24 \pm 0,018$, während in Anwesenheit von EZA eine pH_i -Wert-Änderung von $-0,21 \pm 0,020$ auftrat. Zur Bestimmung der Geschwindigkeit der CO_2 -induzierten intrazellulären Ansäuerung wurde

die Zeitkonstante des Zeitintervalls der CO_2 -Applikation berechnet. Als Zeitkonstante τ (Tau) wird die Zeit bezeichnet, die für eine $1/e$ -fache Änderung des pH_i benötigt wird. Aus der pH_i -Messung von Spermien in Abwesenheit von EZA ergab sich ein Tau-Wert von $52,87 \pm 1,84$ s, während die Anwesenheit von EZA zu einem Tau-Wert von $83,88 \pm 3,25$ s führte. Nachdem die Zuleitung von CO_2 abgestellt wurde, stieg der pH_i wieder nahezu auf den Ausgangswert zurück.

3.3 Spermien aus unterschiedlichen Nebenhodenabschnitten reagieren unterschiedlich auf HCO_3^-

Mittels Immunzytologie und Western-Blot-Analysen konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass die Carboanhydrase IV (CA IV) in Spermien aus Nebenhodenkörper und Nebenhodenschwanz nachweisbar ist, jedoch nicht in Spermien des Nebenhodenkopfes. Daher wurde im folgenden Experiment untersucht, ob Spermien aus den verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens unterschiedlich auf HCO_3^- reagieren (Abbildung 17).

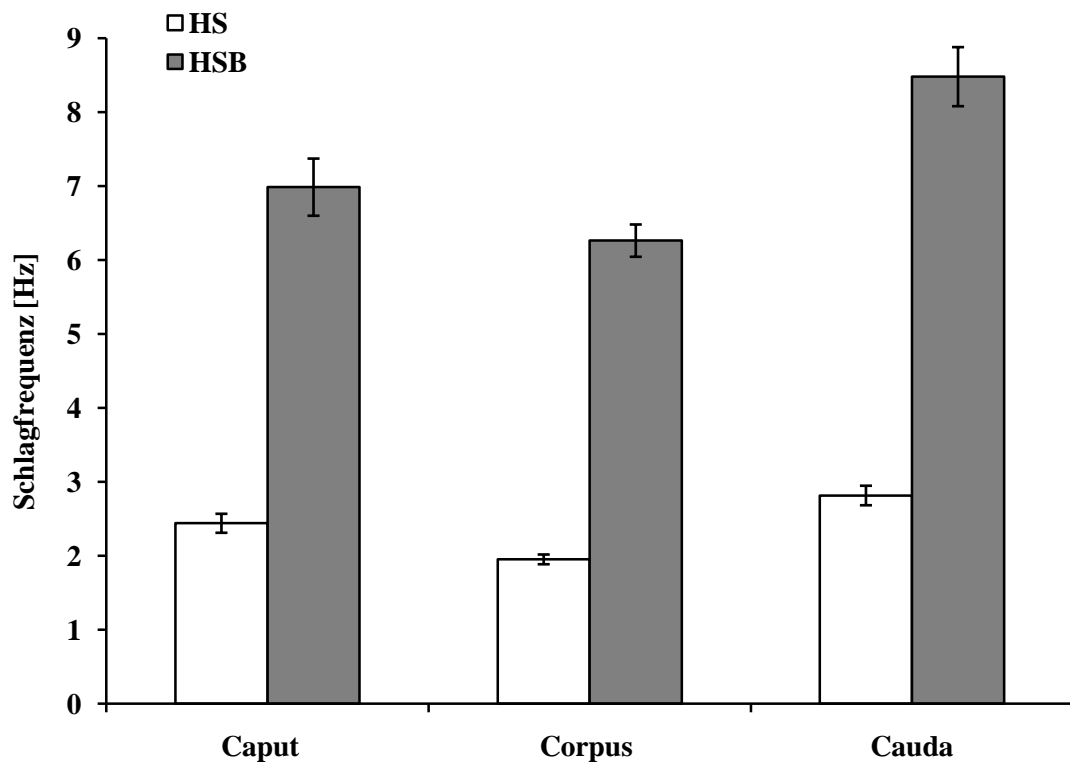


Abbildung 17: Spermien aus verschiedenen Nebenhodenabschnitten reagieren unterschiedlich auf HCO_3^- . In HS-Puffer zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Spermien der verschiedenen Nebenhodenabschnitte (Caput Spermien: $2,42 \pm 0,13$ Hz; Corpus Spermien: $1,95 \pm 0,07$ Hz; Cauda Spermien $2,82 \pm 0,04$ Hz). In Anwesenheit von 15 mM HCO_3^- erreichte die Schlagfrequenz von Spermien des Caputs einen Wert von $6,79 \pm 0,42$ Hz, Spermien des Corpus erreichten einen Wert von $6,09 \pm 0,25$ Hz, während Spermien der Cauda ihre Frequenz auf $8,48 \pm 0,17$ Hz erhöhten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten ($n=30$) \pm Standardfehler.

Hierzu wurden Spermiesuspensionen sowohl von Spermien des Nebenhodenschwanzes (Cauda) als auch des Nebenhodenkörpers (Corpus) sowie des Nebenhodenkopfes (Caput) gewonnen. Im Anschluss erfolgte die Messung der Schlagfrequenz von Spermien der verschiedenen Abschnitte sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Bikarbonat. In Bikarbonat-freiem HS-Puffer zeigten Spermien der unterschiedlichen

Nebenhodenabschnitte keine signifikanten Unterschiede in der Schlagfrequenz (Caput Spermien: $2,82 \pm 0,04$ Hz; Corpus Spermien: $1,95 \pm 0,07$ Hz; Cauda Spermien $2,67 \pm 0,13$ Hz). In Anwesenheit von HCO_3^- beschleunigten Spermien des Caputs ihre Frequenz auf $6,79 \pm 0,42$ Hz, während die Schlagfrequenz von Spermien des Corpus einen Wert von $6,09 \pm 0,25$ Hz erreichte. Spermien der Cauda zeigten die stärkste Antwort auf Bikarbonat, da die Schlagfrequenz im Gegensatz zu Spermien der anderen beiden Nebenhodenabschnitte einen signifikant höheren Wert von $8,48 \pm 0,17$ Hz erreichte.

3.4 Die computergestützte Spermien Analyse (CASA) zeigt Unterschiede in der Motilität von CA IV^{-/-} Spermien und CA IV^{+/+} Spermien

Mit Hilfe der computergestützten Spermien Analyse (CASA) wurden im Gegensatz zur Einzelzellanalyse, bei welcher die Schlagfrequenzen einzelner ausgewählter Spermien gemessen werden, die Motilitätsparameter von CA IV^{+/+} und CA IV^{-/-} Spermien ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Im Vergleich zu Wild-Typ (wt) Tieren ist der prozentuale Anteil motiler Spermien in CA IV^{-/-} Tieren signifikant um 38% reduziert. Dabei beträgt der Anteil motiler Spermien in CA IV^{+/+} Tieren

57,50±4,67% und in CA IV^{-/-} Tieren 35,75±7,46%. Zudem wurde eine signifikante Reduktion der Menge an schnell progressiven Spermien in CA IV^{-/-} Tieren beobachtet. In CA IV^{+/+} Tieren beträgt der Anteil schnell progressiver Spermien 35,38±3,69%, während für CA IV^{-/-} Tiere ein Wert von 20,25±5,29% ermittelt wurde.

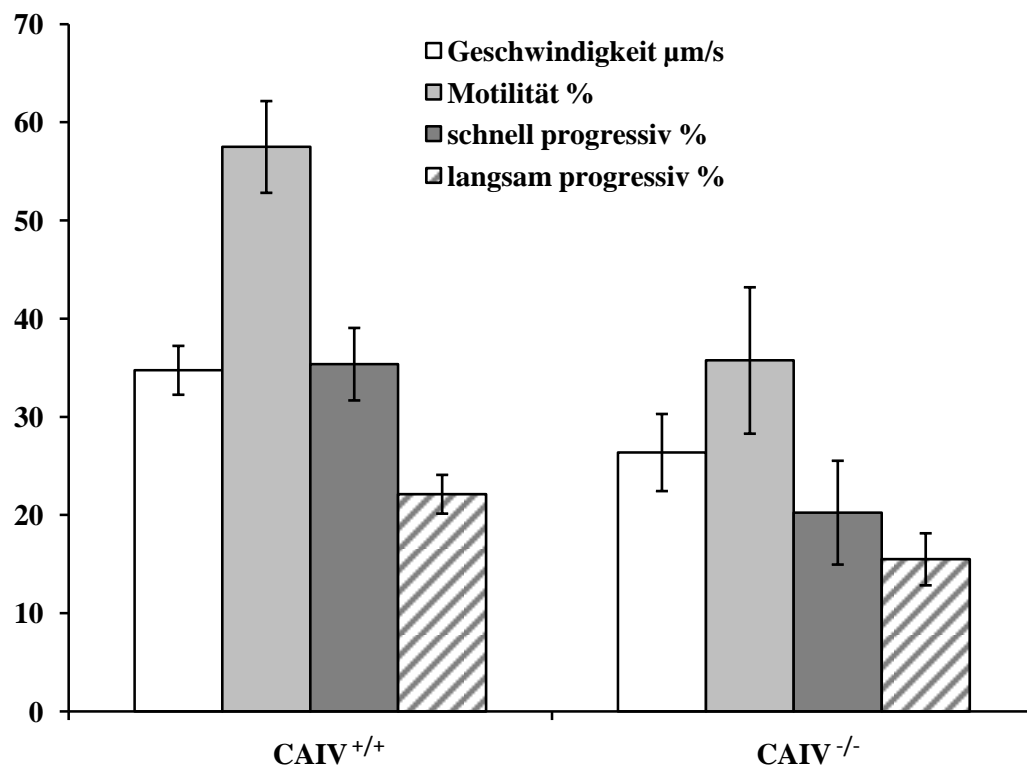


Abbildung 18: Spermien von CA IV^{-/-} Tieren unterscheiden sich in ihrer Motilität von CA IV^{+/+} Spermien. Die Motilitätsparameter wurden mit Hilfe der computergestützten Spermien Analyse (CASA) ermittelt. Im Vergleich zu CA IV^{+/+} Spermien ist die durchschnittliche Geschwindigkeit (µm/s) von CA IV^{-/-} Spermien um 24% reduziert. Der prozentuale Anteil motiler Spermien in CA IV^{-/-} Tieren ist im Vergleich zum Wild-Typ um 38% reduziert. Der Anteil schnell progressiver Spermien beträgt bei CA IV^{+/+} Tieren 35,38±3,69% und bei CA IV^{-/-} Tieren 20,25±5,29%, während der Anteil langsam progressiver Spermien bei CA IV^{+/+} Tieren 22,13±1,97% und bei CA IV^{-/-} Tieren 15,50±2,65% beträgt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 Experimenten (n=8) ± Standardfehler.

Desweiteren sind in CA IV^{-/-} Tieren sowohl die durchschnittliche Geschwindigkeit (µm/s) der Spermien als auch der Anteil langsam progressiver Spermien reduziert, jedoch nicht signifikant. Die durchschnittliche Geschwindigkeit von CA IV^{-/-} Spermien ist um 24% reduziert (CA IV^{+/+}: 34,75±2,49 µm/s; CA IV^{-/-}: 26,38±3,93 µm/s). Der Anteil langsam progressiver Spermien beträgt für CA IV^{+/+} Tiere 22,13±1,97% und für CA IV^{-/-} Tiere 15,50±2,65%.

3.5 In CA IV^{-/-} Spermien ist sowohl die Gesamtcarboanhydraseaktivität als auch die Geschwindigkeit der CO₂-induzierten Beschleunigung der Schlagfrequenz reduziert

Die Gesamtcarboanhydraseaktivität von jeweils 4 x 10⁶ Spermien, sowohl von CA IV^{+/+} als auch von CA IV^{-/-} Tieren, wurde massenspektrometrisch ermittelt. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse dargestellt.

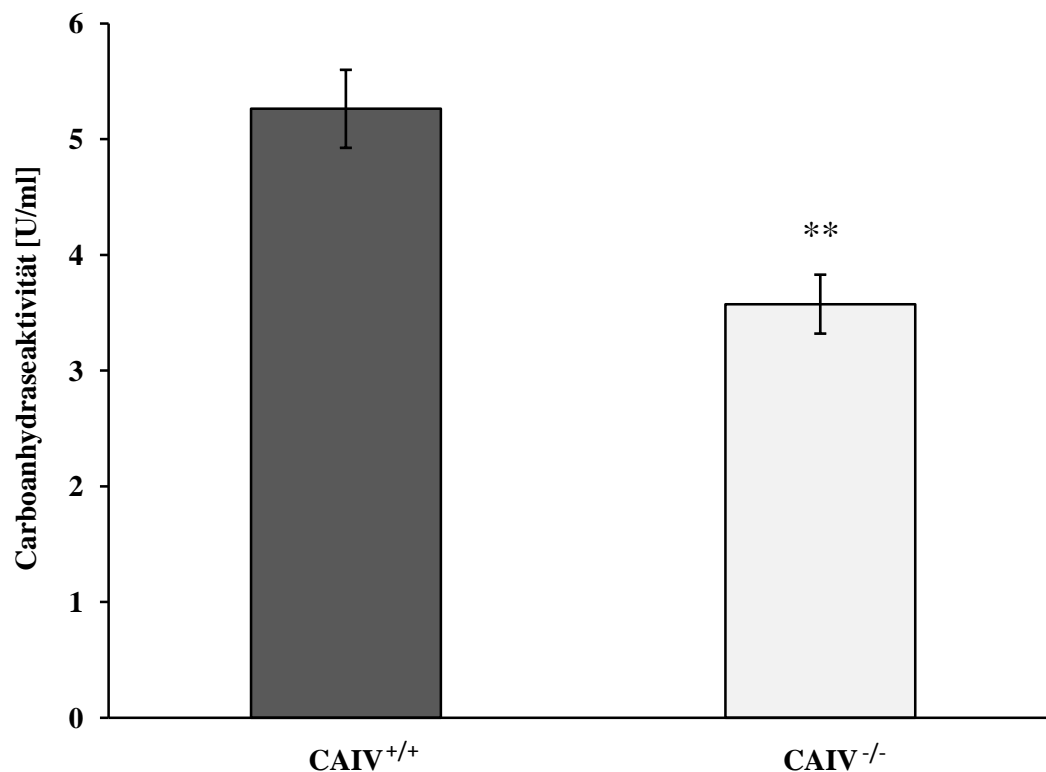
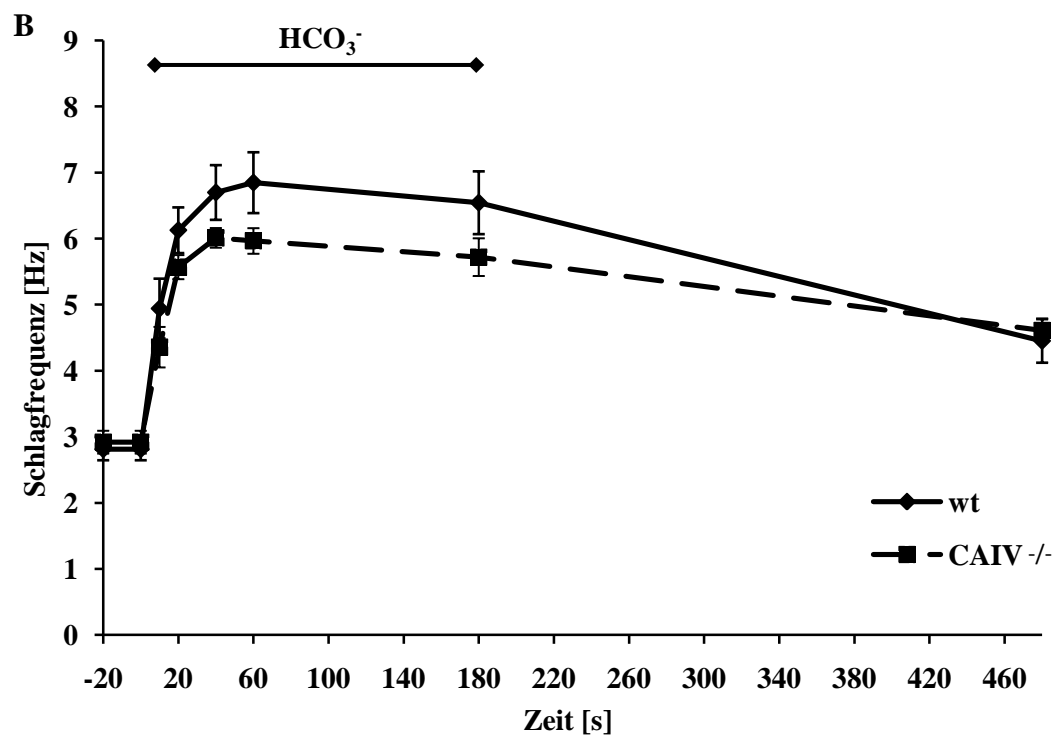
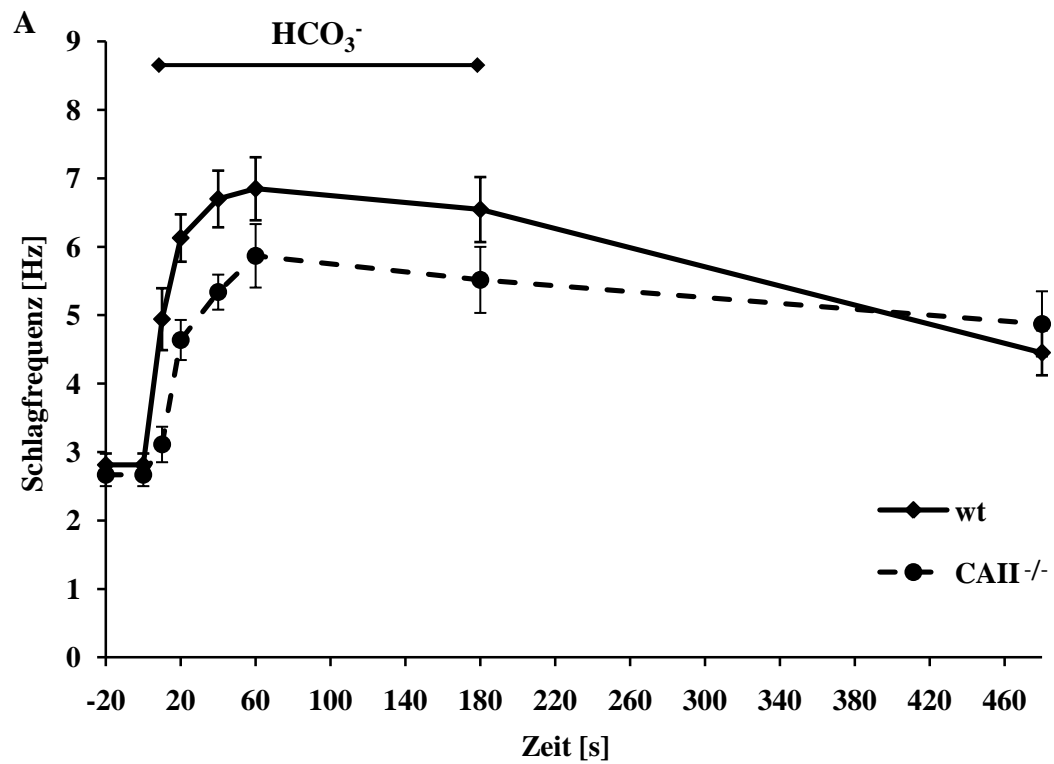


Abbildung 19: Die Gesamtcarboanhydraseaktivität von CA IV KO Spermien ist im Vergleich zu wt-Spermien um 32% reduziert. CA IV^{+/+} Spermien zeigten eine enzymatische Aktivität von 5,26±0,34 U/ml, während für CA IV^{-/-} Spermien ein Wert von 3,57±0,25 U/ml ermittelt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 Experimenten (n=6) ± Standardfehler.

Für die enzymatische Aktivität von Wild-Typ Spermien wurde ein Wert von 5,26±0,34 U/ml ermittelt, während CA IV KO Spermien eine enzymatische Aktivität von 3,57±0,25 U/ml aufweisen. Im Vergleich zu CA IV^{+/+}-Spermien zeigen CA IV^{-/-} Spermien eine hoch signifikante Reduktion der Gesamtcarboanhydraseaktivität um 32% ($p=0,0025$). Im folgenden Experiment wurde die Änderung der Schlagfrequenz von CA II^{-/-}, CA IV^{-/-} und CA XIV^{-/-}-Spermien nach Stimulation mit HCO_3^- sowie CO_2 untersucht.

Hierzu wurde zunächst die Schlagfrequenz der jeweiligen Spermien in HS-Puffer ermittelt (-10 s bis 0 s), bevor die 3-minütige Applikation von HCO_3^- (Abbildung 20), bzw. CO_2 (Abbildung 21) gestartet wurde. Während der 3-minütigen Perifusion mit Bikarbonat-haltigem Puffer (15 mM HCO_3^-) wurde jeweils nach 10 Sekunden, 20 Sekunden, 40 Sekunden, 1 Minute und 3 Minuten die Schlagfrequenz ermittelt (Abbildung 20). 40 Sekunden nach Zugabe von HCO_3^- erhöhte sich die Schlagfrequenz von CA IV^{+/+}-Spermien von $2,81 \pm 0,17$ Hz auf $6,70 \pm 0,41$ Hz, während CA IV^{-/-}-Spermien ihre Frequenz von $2,92 \pm 0,17$ Hz auf $6,01 \pm 0,15$ Hz steigerten. Im Gegensatz dazu wurde in CA II^{-/-}- und CA XIV^{-/-}-Spermien eine zeitliche Verzögerung der Wirkung von HCO_3^- auf die Schlagfrequenz beobachtet, da bei CA II^{-/-}-Spermien nach 40 Sekunden lediglich ein Frequenzanstieg von $2,67 \pm 0,17$ Hz auf $5,34 \pm 0,26$ Hz und bei CA XIV^{-/-}-Spermien von $2,77 \pm 0,12$ Hz auf $5,40 \pm 0,23$ Hz beobachtet werden konnte. 5 Minuten nachdem die Applikation von HCO_3^- beendet wurde, fielen die Schlagfrequenzen wieder nahezu auf ihre Ausgangswerte zurück.



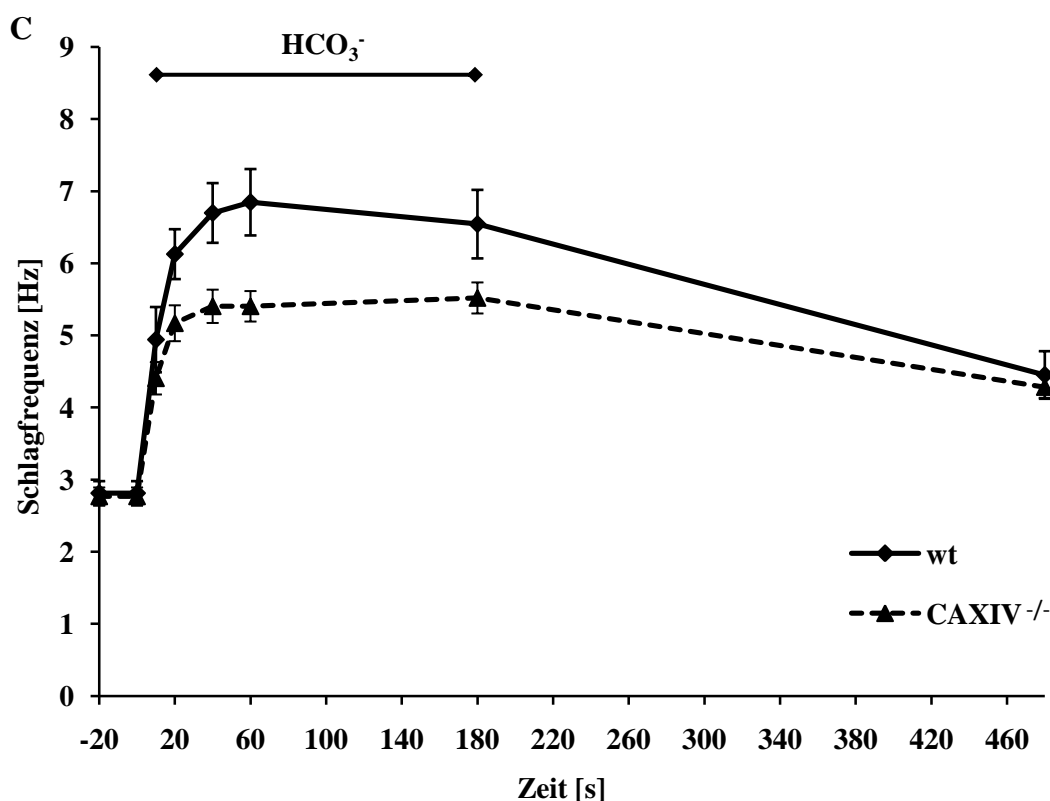
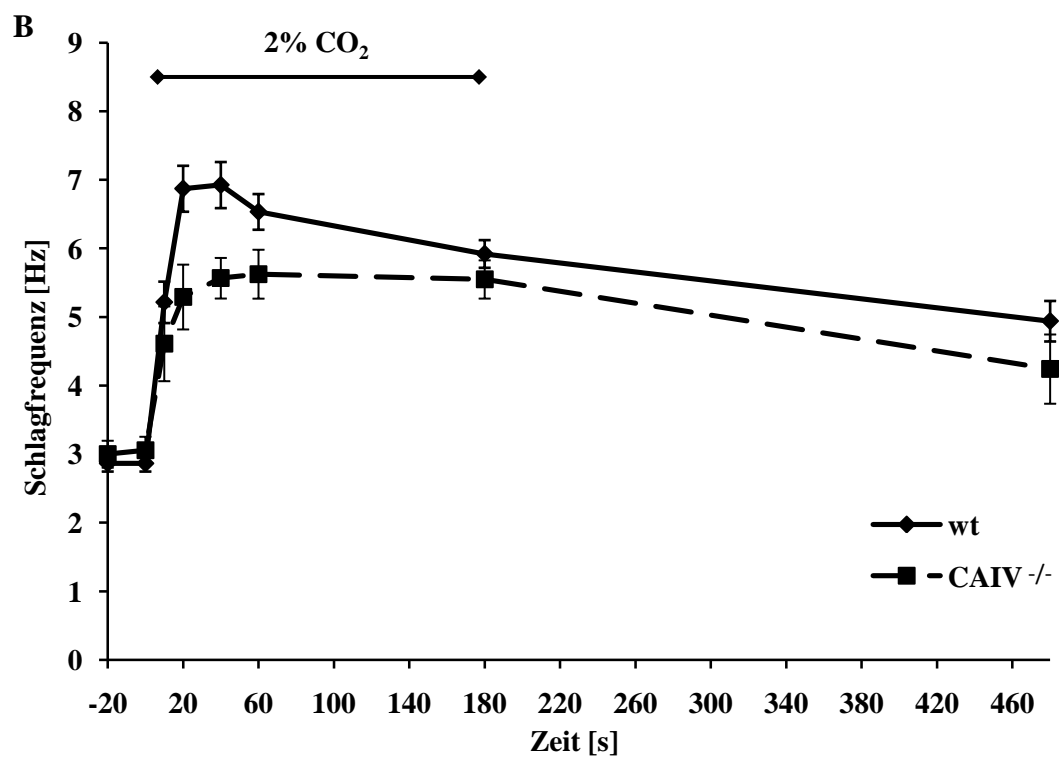
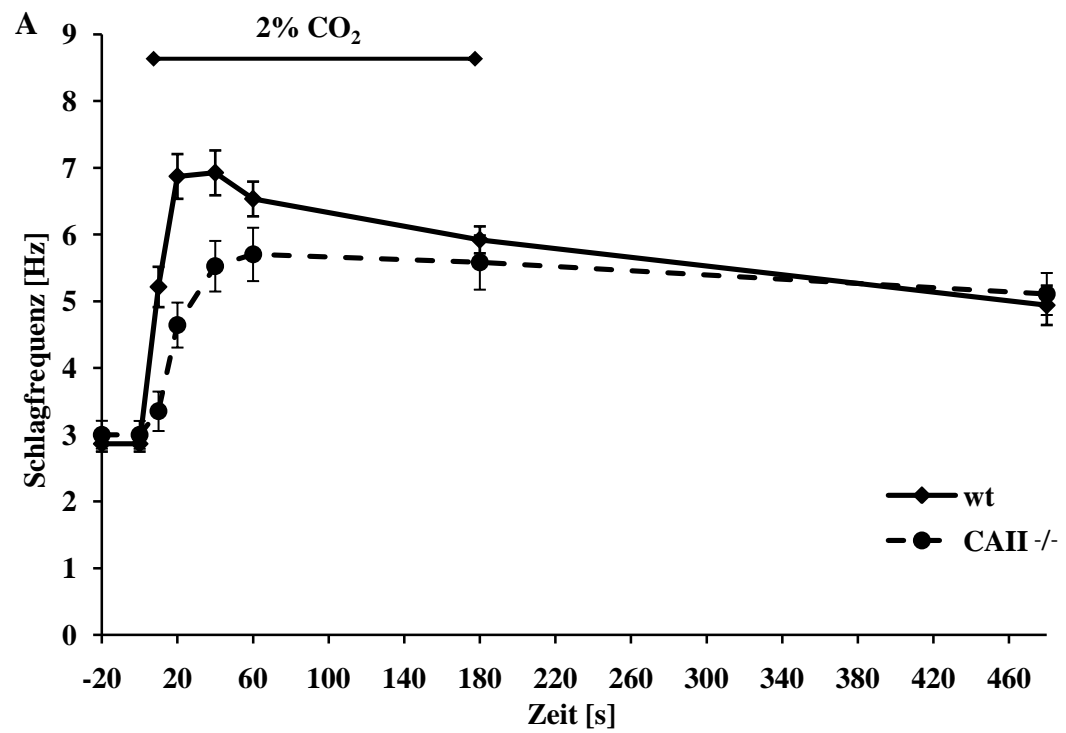


Abbildung 20: Der Effekt von Bikarbonat auf die Schlagfrequenz von Spermien aus verschiedenen CA KO-Mäusen. Nach der Spermienpräparation wurde die Schlagfrequenz von CA II^{-/-} (A), CA IV^{-/-} (B), CA XIV^{-/-} (C) sowie wt-Spermien (durchgezogene Linie) gemessen. 40 Sekunden nach der Zugabe von Bikarbonat erreichten die Schlagfrequenzen der verschiedenen Spermien die folgenden Werte: wt: 6,70±0,41 Hz; CA II^{-/-}: 5,34±0,26 Hz; CA IV^{-/-}: 6,01±0,15 Hz; CA XIV^{-/-}: 5,40±0,23 Hz. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten (n=10) ± Standardfehler.

Während der 3-minütigen Begasung mit 2% CO₂ wurde gleichzeitig mit Puffer perifundiert, welcher mit 2% CO₂ gesättigt war. Es wurde wiederum jeweils nach 10 Sekunden, 20 Sekunden, 40 Sekunden, 1 Minute und 3 Minuten die Schlagfrequenz ermittelt (Abbildung 21).



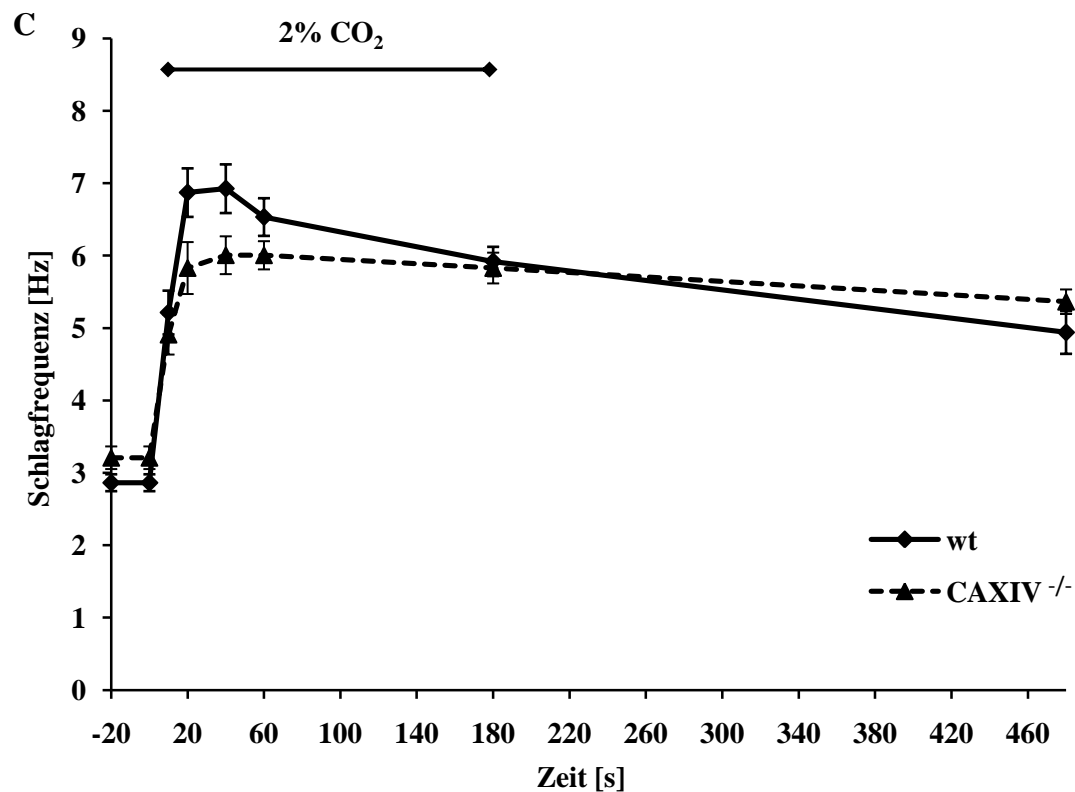


Abbildung 21: Der Effekt von CO₂ auf die Schlagfrequenz von Spermien aus verschiedenen CA KO-Mäusen. Nach der Spermienpräparation wurde die Schlagfrequenz von CA II^{-/-} (A), CA IV^{-/-} (B), CA XIV^{-/-} (C) sowie wt-Spermien (durchgezogene Linie) gemessen. 40 Sekunden nach der Zuleitung von CO₂ erreichten die Schlagfrequenzen der verschiedenen Spermien die folgenden Werte: wt: 6,92±0,34 Hz; CA II^{-/-}: 5,53±0,38 Hz; CA IV^{-/-}: 5,57±0,30 Hz; CA XIV^{-/-}: 6,01±0,26 Hz. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten (n=10) ± Standardfehler.

40 Sekunden nach Zugabe von HCO₃⁻ erhöhte sich die Schlagfrequenz von wt-Spermien von 2,81±0,17 Hz auf 6,70±0,41 Hz, während CA IV^{-/-} Spermien ihre Frequenz von 2,92±0,17 Hz auf 6,01±0,15 Hz steigerten. Im Falle von wt-Spermien stieg die Schlagfrequenz 40 Sekunden nach Zugabe von CO₂ von 2,86±0,14 Hz auf 6,92±0,34 Hz, während CA XIV^{-/-} Spermien ihre

Frequenz von $3,21 \pm 0,16$ Hz auf $6,01 \pm 0,26$ Hz beschleunigten. Zum selben Zeitpunkt wurde bei CA II^{-/-}-Spermien lediglich ein Frequenzanstieg von $3,00 \pm 0,21$ Hz auf $5,53 \pm 0,38$ Hz und bei CA IV^{-/-}-Spermien von $3,00 \pm 0,20$ Hz auf $5,57 \pm 0,30$ Hz gemessen. 5 Minuten nach Beendigung der Applikation von CO₂ fielen die Schlagfrequenzen aller gemessenen Spermien auf Werte zwischen $4,24 \pm 0,50$ Hz (CA IV^{-/-}) und $5,36 \pm 0,17$ Hz (CA XIV^{-/-}).

3.6 CA IV^{-/-} Spermien sowie CA XIV^{-/-} Spermien zeigen Unterschiede in der CO₂-induzierten Verminderung des intrazellulären pH

In Abbildung 16 wurde bereits gezeigt, dass der CA-Inhibitor EZA in Spermien die CO₂-induzierte intrazelluläre Ansäuerung beeinflusst. Da Carboanhydrasen die reversible Reaktion von Wasser und CO₂ zu Bikarbonat und Protonen katalysieren, könnte sich daher der knock out verschiedener CA-Isoformen unterschiedlich auf die intrazelluläre Ansäuerung auswirken. Daher wurden intrazelluläre pH-Messungen an wt-Spermien, CA IV^{-/-}-Spermien und CA XIV^{-/-}-Spermien durchgeführt. Hierzu wurden die Spermien zur Bestimmung des pH_i mit BCECF-AM beladen. Der Verlauf des intrazellulären pH-Werts wurde in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen und ist in Abbildung 22 dargestellt.

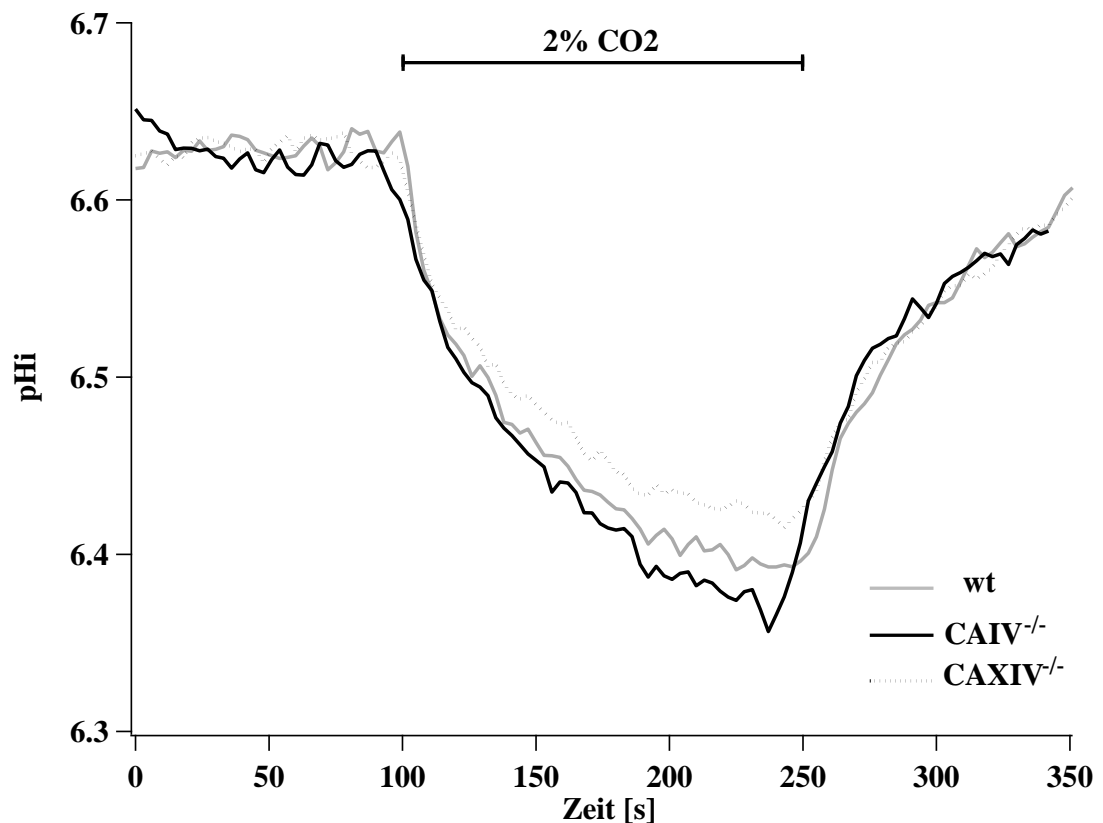


Abbildung 22: CA IV^{-/-} Spermien und CA XIV^{-/-} Spermien zeigen Unterschiede in der CO₂-induzierten intrazellulären Ansäuerung. Die Änderung des intrazellulären pH-Werts (ΔpH_i) durch Stimulation mit 2% CO₂ betrug in wt-Spermien $-0,23 \pm 0,025$ (graue Linie), in CA IV^{-/-} Spermien $-0,27 \pm 0,022$ (schwarze Linie) und in CA XIV^{-/-} Spermien $-0,20 \pm 0,025$ (gepunktete Linie). Für wt-Spermien wurde ein τ -Wert von $43,15 \pm 2,09$ s, für CA IV^{-/-} Spermien ein τ -Wert von $59,92 \pm 2,23$ s und für CA XIV^{-/-} Spermien ein τ -Wert von $46,47 \pm 1,94$ s ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 Experimenten ($n=10$), wobei zugunsten der Übersichtlichkeit keine Standardfehler dargestellt sind.

Zunächst wurden die Spermien für 100 Sekunden mit normalem HS-Puffer perfundiert. Im Anschluss erfolgte die Begasung mit 2% CO₂ für 150 Sekunden, wobei gleichzeitig mit CO₂-gesättigtem HS-Puffer perfundiert wurde. Daraufhin wurden die Spermien erneut für 100 Sekunden mit normalem HS-Puffer perfundiert. Die Applikation von CO₂ bewirkte in wt-

Spermien eine pH_i -Wert-Änderung von $-0,23 \pm 0,025$. Im Vergleich dazu wurde für CA IV^{-/-} Spermien ein ΔpH_i von $-0,27 \pm 0,022$ ermittelt, während sich der pH_i von CA XIV^{-/-} Spermien um $-0,20 \pm 0,025$ änderte. Die Geschwindigkeit der CO₂-induzierten intrazellulären Ansäuerung wurde durch Berechnung der Zeitkonstante τ (Tau) des Zeitintervalls der CO₂-Applikation ermittelt. Für wt-Spermien wurde somit ein τ -Wert von $43,15 \pm 2,09$ s ermittelt, für CA IV^{-/-} Spermien ein τ -Wert von $59,92 \pm 2,23$ s und für CA XIV^{-/-} Spermien ein τ -Wert von $46,47 \pm 1,94$ s. Nachdem die Applikation von CO₂ gestoppt wurde, stieg der pH_i wieder nahezu auf den Ausgangswert zurück.

3.7 cBIMPS, ein cAMP-Analagon, beschleunigt die Schlagfrequenz von Spermien unabhängig von Carboanhydrasen

Es wurde bereits in anderen Publikationen gezeigt, dass Bikarbonat durch Aktivierung der SACY einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt, wodurch über die Aktivierung der PKA die Erhöhung der Schlagfrequenz induziert wird. Die frühe Aktivierung von Spermien durch Bikarbonat ist hierbei ein Resultat der erhöhten cAMP-Konzentration, da cAMP-AM, sowie das cAMP Analagon cBIMPS auch in Abwesenheit von

HCO_3^- zur Erhöhung der Schlagfrequenz in Spermien führen (Carlson, Hille *et al.* 2007). Um diesen Sachverhalt zu überprüfen wurden im folgenden Experiment Spermien für 30 Minuten mit 50 μM cBIMPS stimuliert, wobei je nach 5 min, 10 min, 20 min und 30 min die Schlagfrequenz bestimmt wurde (Abbildung 23).

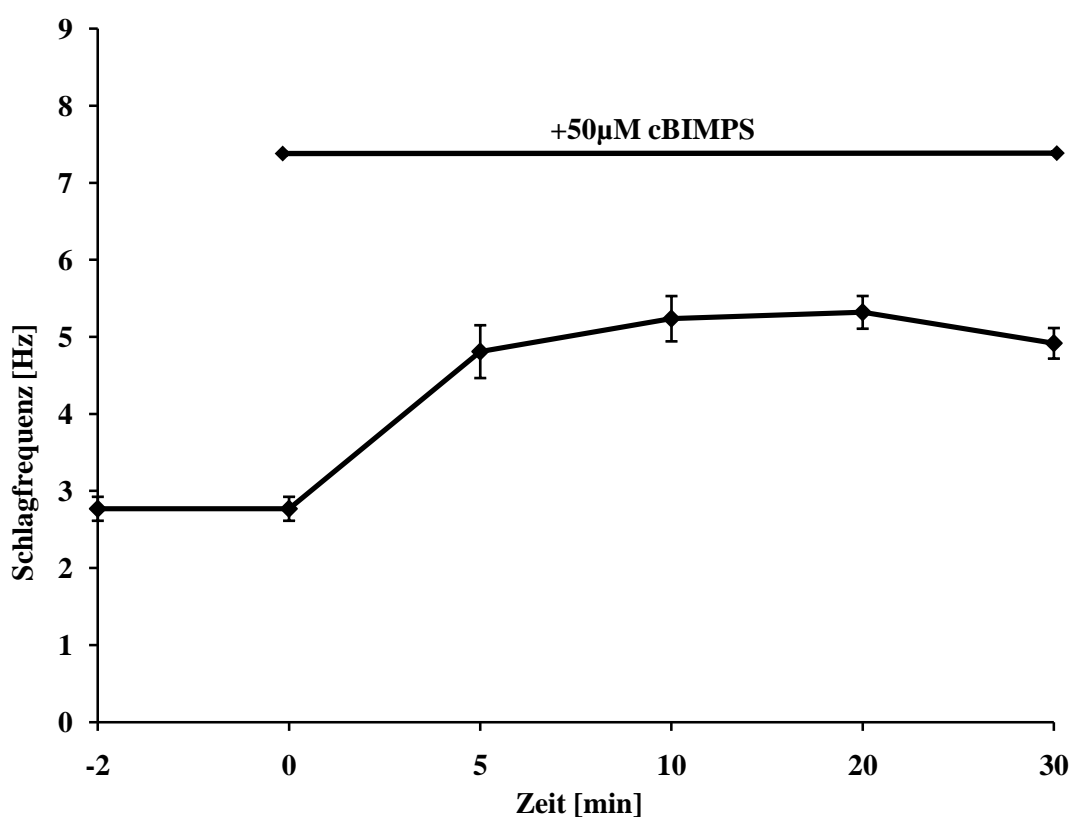


Abbildung 23: Das cAMP analogon cBIMPS beschleunigt die Schlagfrequenz von Spermien innerhalb von 10 Minuten von 3 Hz auf 5 Hz. Jeweils 5, 10, 20 und 30 Minuten nach der Applikation von cBIMPS wurde die Schlagfrequenz ermittelt. Zehn Minuten nach Stimulation erhöhte sich die Frequenz von $2,77 \pm 0,16$ Hz auf $5,24 \pm 0,29$ Hz. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten ($n=16$) \pm Standardfehler.

Durch Perifusion der Spermien mit HS-Puffer, welcher cBIMPS in einer Konzentration von 50 μM enthielt, erhöhte sich deren Schlagfrequenz nach 10 Minuten von $2,77 \pm 0,16$ Hz auf $5,24 \pm 0,29$ Hz und blieb für weitere 20 Minuten nahezu konstant ($5,32 \pm 0,21$ Hz nach 20 Minuten, $4,92 \pm 0,20$ Hz nach 30 Minuten). Um zu untersuchen, ob cAMP unabhängig von Carboanhydrasen die Erhöhung der Schlagfrequenz induziert, wurden Spermien sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von EZA mit cBIMPS stimuliert (Abbildung 24).

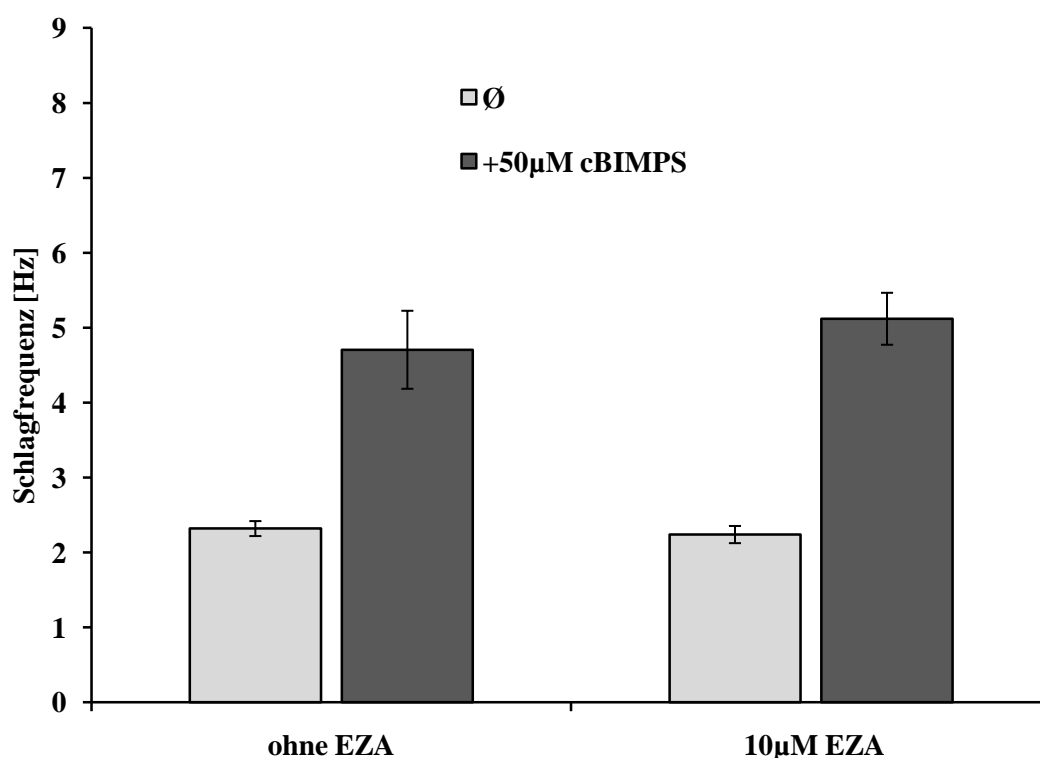


Abbildung 24: Ethoxylolamid hat keinen Einfluss auf die cAMP-vermittelte Erhöhung der Schlagfrequenz von Spermien. Die Messung der Frequenz erfolgte sowohl vor (helle Balken) als auch 10 Minuten nach Zugabe von 50 μM cBIMPS (dunkle Balken). Ohne EZA beschleunigten die Spermien durch Stimulation mit cBIMPS ihre Frequenz von $2,32 \pm 0,10$ Hz auf $4,71 \pm 0,52$ Hz, während mit EZA eine Beschleunigung von $2,24 \pm 0,11$ Hz auf $5,12 \pm 0,35$ Hz beobachtet wurde. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 Experimenten ($n=10$) \pm Standardfehler.

Nachdem Spermien in Petrischalen mit 2 ml HS-Puffer gegeben wurden, welche 10 μM EZA enthielten, wurde die Schlagfrequenz ermittelt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von cBIMPS zu den 2 ml HS-Puffer in einer Endkonzentration von 50 μM . Zehn Minuten nach Zugabe von cBIMPS wurde nochmals die Schlagfrequenz bestimmt. Als Kontrolle wurden parallel zu den Messungen in EZA-haltigem HS-Puffer die gleichen Messungen in EZA-freiem HS-Puffer durchgeführt. Die Stimulation mit cBIMPS bewirkte in EZA-freiem HS-Puffer eine Erhöhung der Schlagfrequenz von $2,32 \pm 0,10$ Hz auf $4,71 \pm 0,52$ Hz. Mit EZA behandelte Spermien zeigten durch Stimulation mit cBIMPS einen vergleichbaren Anstieg der Frequenz von $2,24 \pm 0,11$ Hz auf $5,12 \pm 0,35$ Hz. Dies zeigt, dass EZA keinen Effekt auf die cBIMPS-induzierte Erhöhung der Schlagfrequenz von Spermien besitzt. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob der Effekt von cBIMPS in CA IV^{-/-} Spermien beeinträchtigt ist (Abbildung 25).

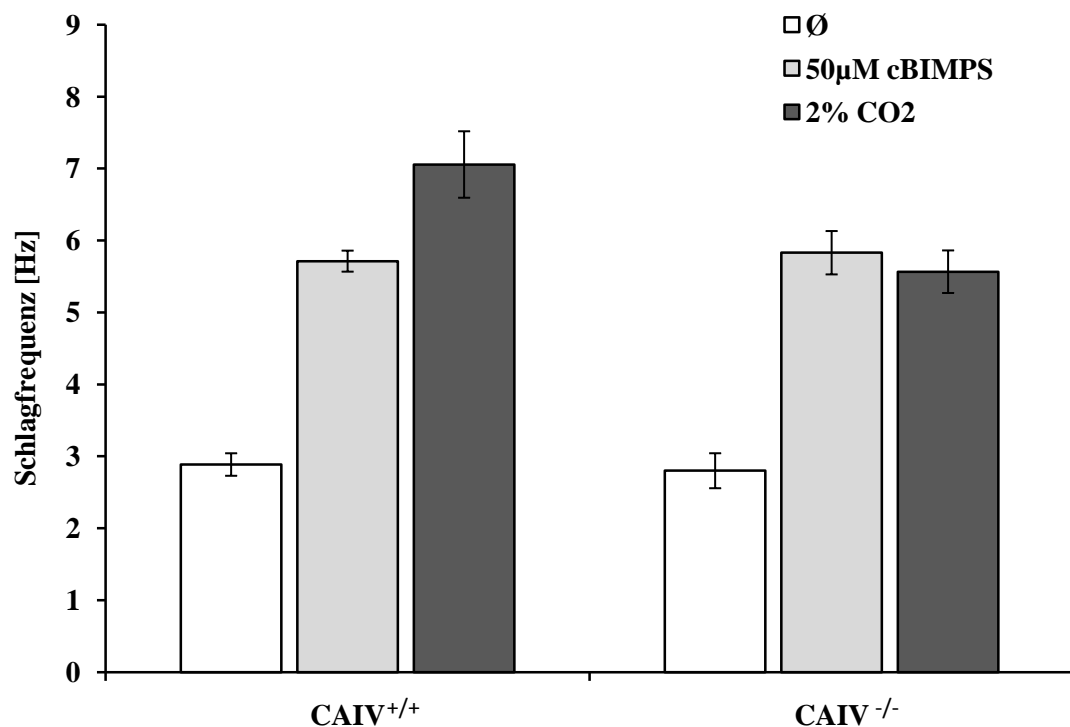


Abbildung 25: In CA IV^{-/-} Spermien ist die cAMP-induzierte Erhöhung der Schlagfrequenz nicht beeinträchtigt. Für CA IV^{+/+} Spermien ergab die Messung in HS-Puffer eine Frequenz von $2,89 \pm 0,16$ Hz, während für CA IV^{-/-} eine Frequenz von $2,80 \pm 0,15$ Hz ermittelt wurde (weiße Balken). Durch Zugabe von cBIMPS (hellgraue Balken) beschleunigten wt- und KO-Spermien ihre Frequenz auf nahezu gleiche Werte (CA IV^{+/+}: $5,71 \pm 0,24$ Hz; CA IV^{-/-}: $5,83 \pm 0,30$ Hz), während KO-Spermien durch Stimulation mit CO₂ (dunkelgraue Balken) einen 20% geringeren Wert erreichten als wt-Spermien (CA IV^{+/+}: $7,08 \pm 0,43$ Hz; CA IV^{-/-}: $5,63 \pm 0,36$ Hz). Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 Experimenten (n=10) \pm Standardfehler.

Hierzu wurde die Schlagfrequenz von CA IV^{-/-} Spermien sowie von CA IV^{+/+} Spermien zunächst in 2 ml HS-Puffer gemessen (CA IV^{+/+}: $2,89 \pm 0,16$ Hz; CA IV^{-/-}: $2,80 \pm 0,15$ Hz). Daraufhin erfolgte entweder die Begasung mit 2% CO₂, wobei gleichzeitig mit CO₂-gesättigtem HS-Puffer perfundiert wurde, oder die Zugabe von cBIMPS in einer Endkonzentration von 50 µM zu den 2 ml HS-Puffer. 20 Sekunden nach Stimulation mit CO₂ erhöhte sich die Schlagfrequenz von CA IV^{+/+} Spermien auf einen Wert von $7,08 \pm 0,43$ Hz,

während die Frequenz von CA IV^{-/-} auf einen 20% geringeren Wert stieg (5,63±0,36 Hz). Nach 10-minütiger Stimulation mit cBIMPS konnte kein Unterschied zwischen CA IV^{-/-} und CA IV^{+/+} Spermien beobachtet werden. CA IV^{+/+} Spermien erhöhten ihre Frequenz auf 5,71±0,24 Hz und CA IV^{-/-} Spermien auf 5,83±0,30 Hz.

3.8 HCO₃⁻ reduziert die CO₂-induzierte intrazelluläre Ansäuerung von Spermien

Die Erhöhung der Schlagfrequenz von Spermien verläuft über die direkte Aktivierung einer atypischen, spermien-spezifischen, löslichen Adenylatzyklase (SACY) durch HCO₃⁻ (Chen, Cann et al. 2000; Sinclair, Wang et al. 2000; Jaiswal and Conti 2001). Hierzu muss HCO₃⁻ entweder über Anionentransporter oder direkt durch Diffusion von CO₂ in die Zelle gelangen. Um den Import von HCO₃⁻ in Spermien genauer zu untersuchen, wurde im folgenden Experiment überprüft, ob die CO₂-induzierte intrazelluläre Ansäuerung durch HCO₃⁻ beeinflusst wird. Zur Bestimmung des intrazellulären pH-Werts wurden die Spermien mit BCECF-AM beladen. Die Änderung des pH_i in Abhängigkeit der Zeit ist in Abbildung 26 dargestellt.

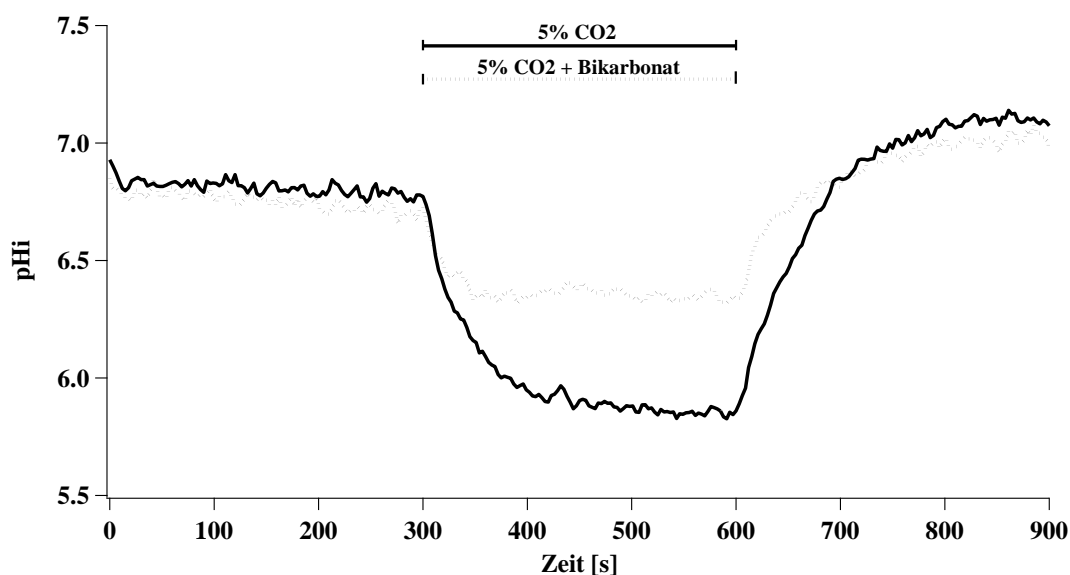


Abbildung 26: HCO_3^- vermindert die CO_2 -induzierte intrazelluläre Ansäuerung von Spermien. Die Änderung des intrazellulären pH-Werts (ΔpH_i) durch Stimulation mit 5% CO_2 betrug -0,92, während durch gleichzeitige Gabe von 15 mM HCO_3^- ein ΔpH_i -0,41 ermittelt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 Experimenten ($n=5$), wobei zugunsten der Übersichtlichkeit keine Standardfehler dargestellt sind.

Zu Beginn der Messung wurden die Spermien für 5 Minuten mit HS-Puffer perfundiert, worauf die 5-minütige Begasung mit 5% CO_2 erfolgte. Während der Begasung wurde entweder weiter mit HS-Puffer umspült oder mit HS-Puffer, welcher 15 mM HCO_3^- enthielt (HSB). Darauf wurde weitere 5 Minuten mit HS-Puffer perfundiert. In Abwesenheit von HCO_3^- sank der pH_i durch die Applikation von CO_2 um 0,92, während durch simultane Applikation von HCO_3^- ein ΔpH_i von -0,41 ermittelt wurde. Nachdem die CO_2 -Zufuhr gestoppt wurde, erreichte der pH_i wieder seinen Ausgangswert.

3.9 Nachweis des Natrium/Bikarbonat-Ko-Transporters NBC1 in murinen Spermien

Im vorangegangenen Experiment wurde gezeigt, dass die CO_2 -bedingte Verminderung des intrazellulären pH durch Zugabe von HCO_3^- abgeschwächt wird. Da dies auf einen Import von HCO_3^- in die Zelle hindeutet, wurde überprüft, ob der Natrium/Bikarbonat-Ko-Transporter NBC1 (SLC4A4) (Cordat and Casey 2009), in Spermien nachweisbar ist. Hierzu wurde zunächst ein Proteinextrakt aus Spermien der Cauda epididymidis und des Ductus deferens hergestellt, welcher anschließend einer Western-Blot Analyse unterzogen wurde (Abbildung 27). Als Kontrolle wurde zusätzlich die gleiche Proteinmenge eines Proteinextrakts der Niere aufgetragen.

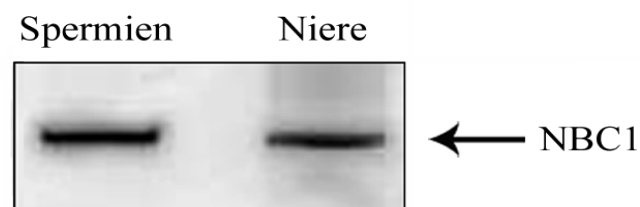
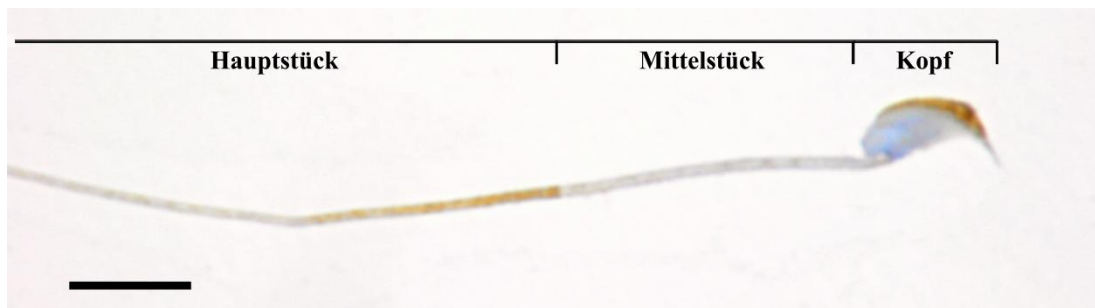


Abbildung 27: Der Natrium/Bikarbonat-Ko-Transporter NBC1 ist in murinen Spermien mittels Western-Blot Analyse nachweisbar. Aufgetragen wurden je 25 μg Proteinextrakt aus murinen Spermien sowie der Niere. In beiden Spuren ist ein NBC1-Signal von etwa 160 kDa erkennbar.

Nach Chemilumineszenzentwicklung wurde ein NBC-1 Signal bei einer Größe von etwa 160 kDa sowohl im Proteinextrakt der Niere als auch im Proteinextrakt von Spermien erkennbar. Zusätzlich zur Western-Blot Analyse wurde die Lokalisation von NBC1 in Spermien immunzytologisch mittels DAB-Färbung untersucht (Abbildung 28).

A**B****C**

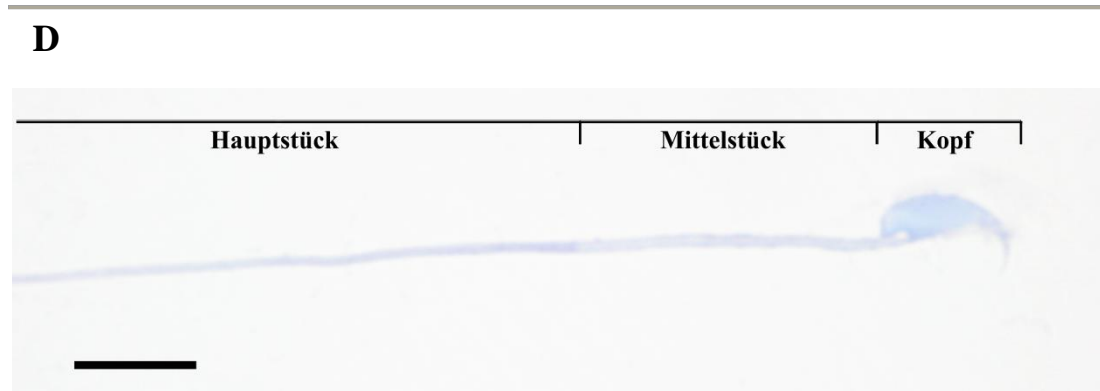


Abbildung 28: Immunocytologischer Nachweis des Natrium/Bikarbonat-Ko-Transporters NBC1 in murinen Spermien mittels DAB-Färbung. In A und C sind Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung gezeigt, während in B und D das jeweilige Spermium bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen wurde. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 20 μm .

Bei Betrachtung der Negativkontrolle, bei welcher kein Primärantikörper verwendet wurde, ist keine Immunreaktion zu erkennen (Abbildung 28 C und D). Durch Verwendung des zuvor erwähnten anti-NBC1-Primärantikörpers konnte nach der Immunreaktion ein NBC1-Signal im Akrosom sowie im Bereich des Hauptstücks des Spermienchwanzes beobachtet werden, welches in Richtung des Endstücks abschwächt (Abbildung 28 A und B).

3.10 Der Anionentransport-Inhibitor DIDS beeinflusst sowohl die HCO_3^- -induzierte Erhöhung der Schlagfrequenz als auch die intrazelluläre Alkalinisierung von Spermien

Um zu untersuchen, ob HCO_3^- zur Erhöhung der Schlagfrequenz über Anionentransporter (z.B. NBC1) in die Zelle gelangt, wurde nach Behandlung von Spermien mit verschiedenen Konzentrationen des Anionentransport-Inhibitors DIDS die Schlagfrequenz untersucht. Hierzu wurden die Spermien für 5 Minuten sowohl in normalem HS-Puffer inkubiert als auch in HS-Puffer, welcher zuvor bereits mit DIDS in der jeweiligen Endkonzentration gelöst wurde. Daraufhin erfolgte die Messung der Schlagfrequenz. Parallel dazu wurden die Messungen in Anwesenheit von 15 mM (HSB-Puffer) durchgeführt. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 29 dargestellt.

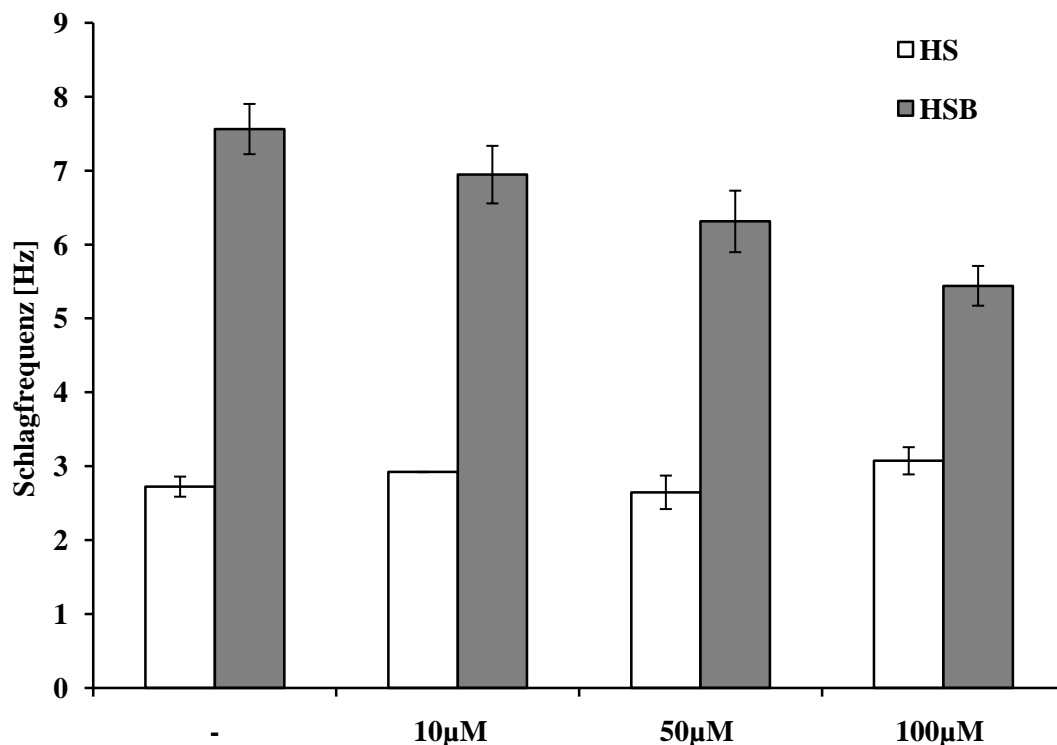


Abbildung 29: Der Anionentransport-Inhibitor DIDS hemmt die HCO_3^- -induzierte Erhöhung der Schlagfrequenz konzentrationsabhängig. In Anwesenheit von 10 μM EZA bewirkt die Gabe von HCO_3^- (graue Balken) einen Anstieg der Schlagfrequenz auf $6,95 \pm 0,39$ Hz, nach Applikation von 50 μM DIDS steigt die Frequenz auf $6,31 \pm 0,42$ Hz, während die Schlagfrequenz in Anwesenheit von 100 μM DIDS auf $5,44 \pm 0,27$ Hz erhöht wird. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 Experimenten ($n=8$) \pm Standardfehler.

Durch Applikation von HCO_3^- erhöhte sich die Schlagfrequenz in Anwesenheit von 10 μM DIDS von $2,92 \pm 0,002$ Hz auf $6,95 \pm 0,39$ Hz, während nach der Gabe von 50 μM DIDS ein Anstieg der Frequenz von $2,65 \pm 0,23$ Hz auf $6,31 \pm 0,42$ Hz beobachtet wurde. Bei Behandlung der Spermien mit 100 μM DIDS wurde nach Stimulation mit HCO_3^- ein Anstieg der Schlagfrequenz von $3,08 \pm 0,18$ Hz auf $5,44 \pm 0,27$ Hz beobachtet. Da in Abwesenheit von DIDS die Applikation von HCO_3^- einen Anstieg der Frequenz von $2,72 \pm 0,14$ Hz auf $7,56 \pm 0,34$ Hz bewirkte, konnte somit durch

Gabe von 100 μM DIDS die Steigerung der Schlagfrequenz um 28% reduziert werden. Es wurde beobachtet, dass HCO_3^- die CO_2 -induzierte Ansäuerung reduziert (Abbildung 26), bzw. dass HCO_3^- nach CO_2 -bedingter Ansäuerung einen Anstieg des pH_i bewirkt (Daten nicht gezeigt), was auf einen Import von HCO_3^- schließen lässt. Daher wurde im folgenden Experiment überprüft, ob der Anionentransport-Inhibitor DIDS den Effekt von HCO_3^- auf den intrazellulären pH-Wert beeinflusst. Nach Beladung mit BCECF wurden Spermien zunächst für 100 Sekunden mit HS-Puffer perfundiert, woraufhin eine Ansäuerung des pH_i durch Begasung mit 5% CO_2 induziert wurde. 150 Sekunden nach Beginn der Begasung mit CO_2 erfolgte die Applikation von HCO_3^- für 100 Sekunden. Nachdem anschließend nochmals für 150 Sekunden mit HS-Puffer perfundiert wurde, folgte nochmals die Applikation von HSB-Puffer für 100 Sekunden, wobei dieser zusätzlich DIDS in einer Endkonzentration von 10 μM enthielt. 150 Sekunden nach der Zugabe von HCO_3^- und DIDS wurde die Applikation von CO_2 gestoppt. Der Verlauf des intrazellulären pH-Werts wurde in Abhängigkeit der Zeit gemessen und ist in Abbildung 30 dargestellt. Nach CO_2 -bedingter intrazellulärer Ansäuerung bewirkte die Zugabe von HCO_3^- einen Anstieg des pH_i um 0,39. Daraufhin sank dieser durch weitere Applikation von CO_2 wieder auf den Ausgangswert. Bei der anschließenden simultanen Applikation von HCO_3^- und DIDS stieg der pH_i lediglich um 0,13.

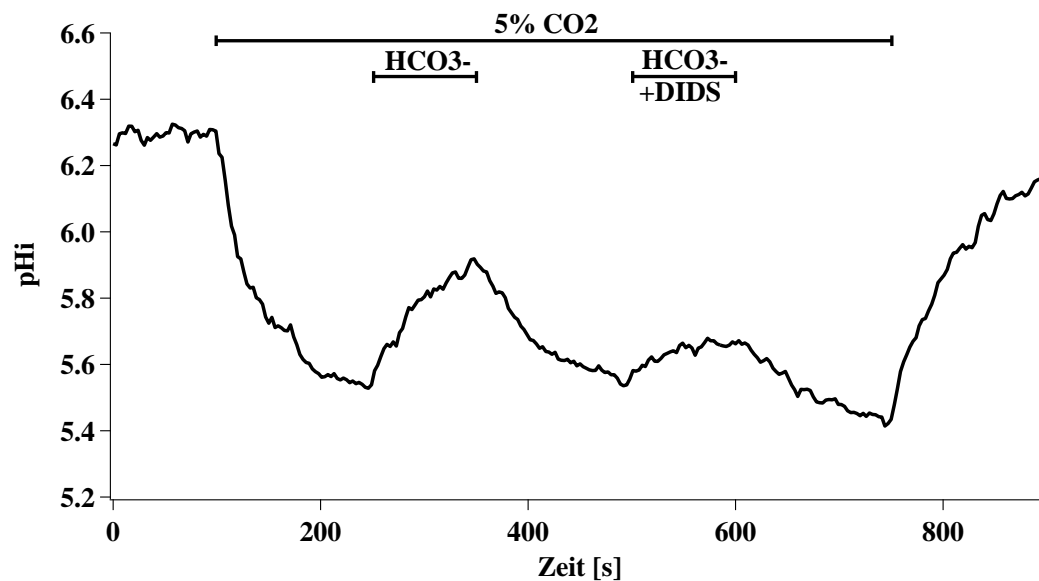


Abbildung 30: DIDS reduziert die HCO_3^- -induzierte intrazelluläre Alkalinisierung von Spermien nach Ansäuerung des pH_i durch CO_2 . Nach CO_2 -induzierter intrazellulärer Ansäuerung wurde durch Stimulation mit HCO_3^- eine Änderung des pH_i um 0,39 beobachtet, wohingegen durch gleichzeitige Gabe von $10 \mu\text{M}$ DIDS ein ΔpH_i von 0,13 ermittelt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten ($n=7$), wobei zugunsten der Übersichtlichkeit keine Standardfehler dargestellt sind.

3.11 Na^+ beeinflusst den HCO_3^- -induzierten Anstieg des intrazellulären pH-Werts von Spermien

Aufgrund der Lokalisation des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Ko-Transporters NBC1 in Spermien (siehe Abbildung 27 und 28) wurde im folgenden Experiment untersucht, ob der HCO_3^- -induzierte Anstieg des intrazellulären pH-Werts Na^+ -abhängig ist. Hierzu wurden Spermien nach Beladung mit BCECF zunächst für 100 Sekunden mit HS-Puffer perifundiert, woraufhin eine

Ansäuerung des pH_i durch Begasung mit 2% CO_2 induziert wurde. Während der Begasung mit CO_2 wurden die Spermien mit CO_2 -gesättigtem HS-Puffer perfundiert. 200 Sekunden nach Beginn der Begasung mit CO_2 erfolgte die 150-sekündige Applikation von HCO_3^- . Die Applikation von CO_2 wurde 200 Sekunden nach der Zugabe von HCO_3^- gestoppt. Parallel dazu wurde dieselbe Messung in Natrium-freiem Puffer durchgeführt, wobei Na^+ durch N-methyl-D-glucamin (NMDG) ersetzt wurde, welches sich durch eine ähnliche osmotische Aktivität auszeichnet.

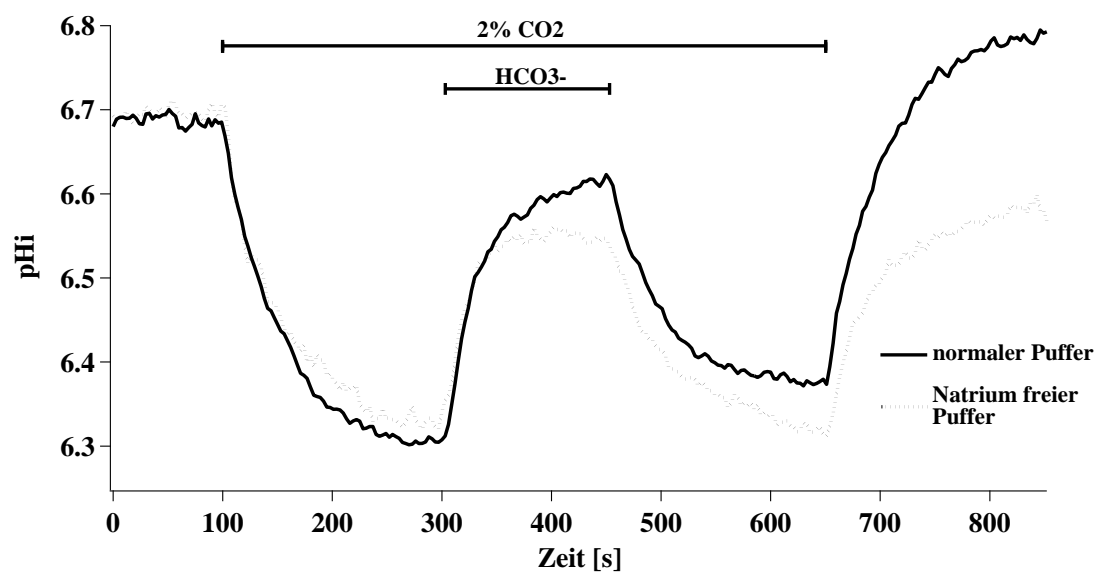


Abbildung 31: Natrium beeinflusst die HCO_3^- -induzierte intrazelluläre Alkalinisierung von Spermien nach Ansäuerung des pH_i durch CO_2 . In Na^+ -freiem Puffer wurde Na^+ durch N-methyl-D-glucamin (NMDG). Nach CO_2 -induzierter intrazellulärer Ansäuerung wurde in Anwesenheit von Na^+ durch Stimulation mit HCO_3^- eine Änderung des pH_i um 0,29 beobachtet (schwarze Linie), wohingegen in Na^+ -freiem Puffer ein ΔpH_i von 0,21 ermittelt wurde (gepunktete Linie). Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 Experimenten ($n=10$), wobei zugunsten der Übersichtlichkeit keine Standardfehler dargestellt sind.

Der Verlauf des intrazellulären pH-Werts wurde in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen und ist in Abbildung 31 dargestellt.

In Anwesenheit von Na^+ bewirkte die Zugabe von HCO_3^- nach CO_2 -bedingter intrazellulärer Ansäuerung einen Anstieg des pH_i um 0,29. In Na^+ -freiem Puffer wurde durch Applikation von HCO_3^- lediglich ein Anstieg des pH_i um 0,21 ermittelt.

4 Diskussion:

Die Reifung und Speicherung von Spermien im Nebenhoden erfordert sowohl ein saures Milieu als auch eine geringe Bikarbonatkonzentration (*Levine and Marsh 1971; Levine and Kelly 1978; Carr, Usselman et al. 1985*). Verantwortlich für die Ansäuerung des Nebenhodensekrets sind H^+ -ATPasen und Natrium/Protonen-Austauscher (NHE 2/3), welche in der apikalen Membran der Epithelzellen lokalisiert sind (*Breton, Smith et al. 1996; Bagnis, Marsolais et al. 2001*). Im Nebenhoden, wie auch in anderen protonen-sezernierenden Epithelien tritt ein Transport von Bikarbonat auf, welcher ebenfalls zur Ansäuerung des Lumens beiträgt. Involviert in den transepithelialen Säure/Base-Transport ist ein Natrium/Bikarbonat-Ko-Transporter (NBC) (*Jensen, Schmitt et al. 1999*). Außerdem wurden im Nebenhoden etlicher Spezies wie Mensch, Maus, Ratte, Bulle, Pferd und Kaninchen bereits verschiedene CA-Isoformen nachgewiesen (*Ekstedt and Ridderstrale 1992; Asari, Sasaki et al. 1996*). Die Beobachtung, dass durch Applikation des CA-Inhibitors Azetazolamid sowohl in der Cauda epididymidis als auch im Vas deferens eine Erhöhung des luminalen pH-Werts induziert wird (*Au and Wong 1980; Jensen, Schmitt et al. 1999*), deutet darauf hin, dass CA's in die intraluminale Ansäuerung involviert sind. Die genaue Funktion von CA's im Nebenhoden ist noch nicht geklärt. Da ein NBC sowie die extrazellulär lokalisierte CA IV in der Niere für die Bikarbonatresorption aus dem Primärharn und die luminale Ansäuerung

verantwortlich sind (*Breton 2001; Cordat and Casey 2009*) deutet darauf hin, dass NBC's und CA's im Nebenhoden eine ähnliche Rolle bei der Ansäuerung des Sekrets übernehmen. Eine saure Umgebung sowie eine geringe Bikarbonatkonzentration sind nicht nur wichtig für die Spermienreifung im Nebenhoden, sondern bewirken auch, dass reife Spermien während der Speicherung im Organ in einem immotilen Stadium verharren. Erst die erhöhte Bikarbonatkonzentration im Seminalplasma induziert die Aktivitätssteigerung der Spermien. Demnach gilt Bikarbonat sowohl bei der Bereitstellung fertiler Spermien im männlichen Reproduktionstrakt als auch bei der frühen Aktivierung von Spermien im Uterus als wichtiger Faktor (*Visconti, Stewart-Savage et al. 1999; Wennemuth, Babcock et al. 2003; Shum, Da Silva et al. 2009*). Zudem wird in Spermien sowohl Motilität, Chemotaxis, Kapazitation als auch die Akrosomenreaktion durch den Anstieg des intrazellulären pH sowie der intrazellulären Kalziumkonzentration reguliert. In humanen Spermien ist der spannungsgesteuerte Protonenkanal Hv1 für den Austritt von H^+ -Ionen verantwortlich, während der pH-abhängige Ca^{2+} -Kanal CatSper für den Einstrom von Kalziumionen verantwortlich ist (*Lishko and Kirichok 2010; Lishko and Kirichok 2010*). Die frühe Aktivierung der Spermien wird durch die erhöhte Bikarbonatkonzentration im Seminalplasma induziert, indem HCO_3^- eine spermien-spezifische, zytosolische Adenylatzyklase (SACY) aktiviert (*Okamura, Tajima et al. 1985; Chen, Cann et al. 2000; Sinclair, Wang et al. 2000*). Der daraus resultierende Anstieg der intrazellulären

cAMP-Konzentration bewirkt die Aktivierung der Proteinkinase A (*Nolan, Babcock et al. 2004*), welche verschiedene Zielproteine phosphoryliert (*Visconti, Ning et al. 1999*) und demzufolge verschiedene Zellantworten, wie beispielsweise die Aktivierung von Ionenkanälen sowie die Steigerung der Schlagfrequenz, ausgelöst werden.

Durch lokale Perifusion von murinen Spermien mit Bikarbonat in vitro eine Beschleunigung der Schlagfrequenz von 2-3 Hz auf 7 Hz oder mehr auftritt (*Wennemuth, Carlson et al. 2003*). Da durch Stimulation der Spermien mit Bikarbonat eine Steigerung der Schlagfrequenz von $2,82 \pm 0,04$ Hz auf $8,48 \pm 0,17$ Hz beobachtet wurde. Im Inneren von Zellen reagiert CO_2 auch in Abwesenheit von Carboanhydrasen spontan mit H_2O zu Bikarbonat. Daher wurde vermutet, dass auch die Applikation von CO_2 die Schlagfrequenz von Spermien beeinflusst. Um dies zu überprüfen wurden Messungen durchgeführt, bei denen Spermien mit 5% CO_2 begast wurden. Die Stimulation mit CO_2 resultierte in einer Beschleunigung der Schlagfrequenz auf einen Wert von $7,94 \pm 0,31$ Hz (Abbildung 11) und bewirkt demnach eine vergleichbare Erhöhung der Frequenz, wie die Stimulation mit HCO_3^- . Somit reagieren murine Spermien nicht nur auf Bikarbonat, sondern auch auf CO_2 mit einer Erhöhung der Schlagfrequenz. Die Aktivierung der SACY und demzufolge die Erhöhung der Schlagfrequenz wird allerdings durch Bikarbonat induziert (*Okamura, Tajima et al. 1985; Chen, Cann et al. 2000; Sinclair, Wang et al. 2000*). Somit muss CO_2 extra- oder intrazellulär

zunächst in Bikarbonat umgewandelt werden. Da diese Reaktion in vielen unterschiedlichen Geweben und Zelltypen wie z.B. Auge, Erythrozyten, Gastrointestinaltrakt, Gehirn, Lunge und Niere durch Carboanhydrasen katalysiert wird (*Ghandour, Langley et al. 1992; Fleming, Parkkila et al. 1995; Kaunisto, Parkkila et al. 1995; Wistrand, Carter et al. 1999; Rebello, Ramesar et al. 2004; Shah, Ulmasov et al. 2005; Svichar, Waheed et al. 2009*) lässt vermuten, dass CA auch bei der Bereitstellung von Bikarbonat in Spermien beteiligt sind. In einem weiteren Versuch sollte der Einfluss zweier verschiedener CO₂-Konzentrationen auf den Verlauf der Schlagfrequenz untersucht werden (Abbildung 12). Durch Applikation von 5% CO₂ trat bereits nach 6 Minuten eine Steigerung der Frequenz auf einen nahezu maximalen Wert von $8,37 \pm 0,58$ Hz auf, während die Schlagfrequenz durch Begasung mit 2% CO₂ nach 10 Minuten gerade einen Wert von $6,96 \pm 0,69$ Hz erreichte. Nach längerer Begasungszeit mit 2% CO₂ erreichte die Frequenz ähnlich hohe Werte wie nach Applikation von 5% CO₂. Somit wird die, zur maximalen Frequenzsteigerung intrazellulär benötigte Bikarbonatkonzentration, umso schneller erreicht je höher die Konzentration des applizierten CO₂ ist. Um zu überprüfen ob Carboanhydrasen in die CO₂-induzierte Beschleunigung der Schlagfrequenz involviert sind, wurden Spermien in einem weiteren Versuch 5 Minuten mit dem CA-Inhibitor Ethoxyzolamid inkubiert, bevor die Stimulation mit 5% CO₂ erfolgte (Abbildung 13). Ethoxyzolamid gehört zu den klassischen CA-Inhibitoren, zeigt allerdings außer zu CA IV starke Affinität zu den Isoformen II, V, VI, VII, IX, XII, XIII und XIV (Supuran Claudiu

T., et al 2008) und ist dementsprechend ein relativ unspezifischer Inhibitor. Die Beobachtung, dass Spermien in Anwesenheit von EZA 2 Minuten länger benötigen, um nach Stimulation mit CO₂ ihre Schlagfrequenz auf einen maximalen Wert zu beschleunigen, deutet auf die Aktivität von CA's hin. Um diese Vermutung zu bestätigen wurden, mit Hilfe eines Massenspektrometers, Messungen der Gesamtcarboanhydraseaktivität von Spermien durchgeführt. Die Auswertung der Messdaten ergab, dass durch Zugabe des Inhibitors eine signifikante Reduktion der Gesamtcarboanhydraseaktivität um bis zu 62% erzielt wird (Abbildung 14). Somit konnte die enzymatische Aktivität von Carboanhydrasen in Spermien erfolgreich nachgewiesen werden.

Es wurde gezeigt, dass durch Hemmung von Carboanhydrasen die CO₂-induzierte Erhöhung der Schlagfrequenz beeinflusst wird. Da bisher nicht bekannt ist, ob Bikarbonat über Transportproteine in die Spermienzelle gelangt oder in Form von CO₂ über die Plasmamembran diffundiert und dort zu Bikarbonat umgewandelt wird, könnten CA auch in die Bikarbonat-vermittelte Beschleunigung der Schlagfrequenz involviert sein. Um dies zu überprüfen, wurde der Effekt der Carboanhydraseinhibitoren Ethoxyzolamid (EZA) und Azetazolamid (AZA) auf die Frequenz von Spermien nach Stimulation mit Bikarbonat untersucht. Ohne Behandlung mit CA Inhibitoren stieg die Schlagfrequenz auf $7,84 \pm 0,40$ Hz. Durch Applikation von 100 µM EZA konnte die Steigerung der Frequenz um bis zu 46% reduziert werden.

Nach Applikation von 100 μM AZA wurden ähnliche, jedoch leicht geringere inhibitorische Effekte beobachtet. Die Erhöhung der Schlagfrequenz durch Bikarbonat, wurde hierbei im Vergleich zu unbehandelten Spermien um 35% reduziert (Abbildung 15). Diese Ergebnisse zeigen, dass CA auch an der Bikarbonat-induzierten Frequenzerhöhung von Spermien beteiligt sind, wodurch auszuschließen ist, dass es sich bei dem zugrunde liegenden Mechanismus lediglich um den Transport von Bikarbonat durch HCO_3^- -Transporter handelt. Bei der Diffusion von CO_2 in Erythrozyten entstehen durch intrazelluläre Carboanhydrasen HCO_3^- und H^+ , woraus eine intrazelluläre Ansäuerung resultiert (*Blank and Ehmke 2003*). Um zu überprüfen, ob in Spermien aufgrund der Aktivität von Carboanhydrasen ein ähnlicher Effekt auftritt, wurde während der Applikation von CO_2 der zeitliche Verlauf des intrazellulären pH-Werts ermittelt (Abbildung 16). Die Begasung mit 2% CO_2 führte zu einer raschen intrazellulären Ansäuerung mit einem τ -Wert von $52,87 \pm 1,84$ s und einem ΔpH_i von -0,24. Dies deutet daraufhin, dass CO_2 auch in Spermien durch intrazelluläre CA zu Protonen und HCO_3^- umgewandelt wird, welches somit die Erhöhung der Schlagfrequenz induziert. Auch in Anwesenheit des CA-Inhibitors EZA wurde durch Behandlung der Spermien mit CO_2 eine Ansäuerung des pH_i erzielt. Allerdings wurde hierbei ein leicht geringerer ΔpH_i von -0,21 sowie eine Verlangsamung des Ansäuerungsprozesses auf einen τ -Wert von $83,88 \pm 3,25$ s beobachtet. Die CO_2 -bedingte intrazelluläre Ansäuerung kann demnach durch Behandlung mit EZA nicht vollständig inhibiert werden. Ein

Grund hierfür ist die Tatsache, dass die Reaktion von CO_2 zu HCO_3^- auch spontan in Abwesenheit von Carboanhydrasen abläuft. Desweiteren könnte, außer einer zu geringen Inhibitorkonzentration von $10 \mu\text{M}$, auch die Tatsache von Bedeutung sein, dass EZA aufgrund seiner geringen Spezifität sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre CA hemmt. Bei humanen CA wurde gezeigt, dass EZA beispielsweise mit einer höheren Affinität an die extrazelluläre CA XIV ($K_i=2,5 \text{ nm}$) als an die intrazelluläre CA II ($K_i=8 \text{ nm}$) oder die extrazelluläre CA IV ($K_i=93 \text{ nm}$) bindet (*Supuran 2008*). Im Versuch könnten demnach extrazelluläre CA CO_2 zu Bikarbonat umsetzen, wodurch

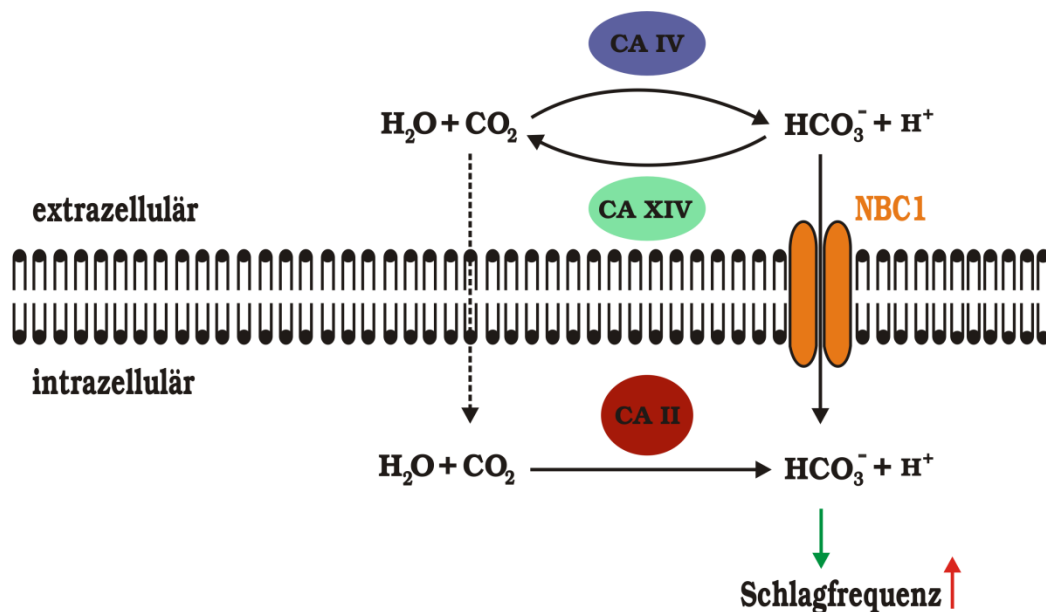


Abbildung 32: Die extrazellulären CA-Isoformen IV und XIV arbeiten in Spermien in gegenläufige Richtung, wodurch extrazellulär ein Gleichgewicht zwischen CO_2 und HCO_3^- vorliegt. CO_2 diffundiert über die Plasmamembran in die Spermienzelle und wird dort durch die intrazelluläre CA II zu HCO_3^- umgewandelt, welches die Erhöhung der Schlagfrequenz induziert. Parallel dazu findet ein Bikarbonatimport über Anionentransporter statt, wobei NBC1 nur eine untergeordnete Rolle spielt.

die Konzentration an extrazellulärem CO₂ und somit die intrazelluläre Ansäuerung vermindert würde. Durch Inhibition von extrazellulären CA stünde somit mehr CO₂ zur Diffusion in die Zelle zur Verfügung, was den inhibitorischen Effekt auf intrazelluläre CA maskieren könnte. Carboanhydrasen sind somit sowohl nach Stimulation von Spermien mit Bikarbonat als auch nach Stimulation mit CO₂ an der Beschleunigung der Schlagfrequenz beteiligt (Abbildung 32). Bisher wurde nicht vollständig geklärt, welche Isoformen von Carboanhydrasen in Spermien vorhanden sind. Die ubiquitäre, zytosolische Carboanhydrase II (CA II) konnte jedoch in großer Menge in Spermien nachgewiesen werden (*Parkkila, Kaunisto et al. 1991; Mezquita, Mezquita et al. 1999*). Zudem legten Ekstedt und Holm 2004 nahe, dass die Carboanhydrase IV (CAIV) von Epithelzellen des Nebenhodenkörpers der Maus zur Plasmamembran des Spermenschwanzes transferiert wird (*Ekstedt, Holm et al. 2004; Wandernoth, Raubuch et al. 2010*). Unsere Arbeitsgruppe konnte sowohl durch immunzytologische Färbungen als auch durch Western-Blot Analysen zeigen, dass CA IV erst in Spermien des Nebenhodenkörpers und der darauffolgenden Nebenhodenabschnitte nachweisbar ist, nicht jedoch in Spermien des Nebenhodenkopfes (*Wandernoth, Raubuch et al. 2010*). Mit dieser Arbeit wurde erstmals die physiologische Rolle von CA IV in murinen Spermien gezeigt. Außerdem konnte die Anwesenheit von CA IV auch in humanen ejakulierten Spermien nachgewiesen werden (*Ficarro, Chertihin et al. 2003*). Es wäre denkbar, dass außer der CA IV auch andere extrazelluläre

Carboanhydrasen auf dem Weg der Spermien durch den Nebenhoden zu deren Oberfläche transferiert werden. Demzufolge müssten Spermien aus verschiedenen Nebenhodenabschnitten Unterschiede in ihrer Reaktion auf Bikarbonat zeigen. Um dies zu überprüfen wurde in der vorliegenden Arbeit die Schlagfrequenz von Spermien gemessen, welche aus unterschiedlichen Nebenhodenabschnitten isoliert wurden (Abbildung 17). Bei der Bestimmung der Grundschatzfrequenz in Bikarbonat-freiem HS-Puffer konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Spermien der verschiedenen Nebenhodenabschnitte beobachtet werden. Nach Stimulation mit Bikarbonat beschleunigten jedoch Spermien der Cauda im Vergleich zu Spermien der beiden früheren Nebenhodenabschnitte ihre Schlagfrequenz auf einen signifikant höheren Wert von $8,48 \pm 0,17$ Hz (Caput Spermien: $6,79 \pm 0,42$ Hz; Corpus Spermien: $6,09 \pm 0,25$ Hz). Dieser Unterschied könnte somit darauf zurückzuführen sein, dass CA zwar im Corpus zur Spermienoberfläche transferiert werden, jedoch erst in der Cauda ihre enzymatische Aktivität entfalten.

Um den Einfluss der Carboanhydrase IV genauer untersuchen zu können, ist die Benutzung von CA-Inhibitoren ungeeignet, da diese stets starke Affinität zu mehreren CA-Isoformen besitzen (*Supuran 2008*). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auch mit Spermien von CA II^{-/-}, CA IV^{-/-} und CA XIV^{-/-}-Mauslinien gearbeitet, wobei sich zunächst die Frage nach der Fertilität dieser Tiere stellt. Während sowohl männliche als auch weibliche CA XIV^{-/-}-

Tiere eine normale Fertilität aufweisen sind weibliche CA IV^{-/-}-Tiere infertil. Zur Aufrechterhaltung einer lebenden Kolonie dieser Tiere können heterozygote Weibchen mit homozygoten Männchen verpaart werden (Shah, Ulmasov et al. 2005). Auch weibliche CA II^{-/-}-Tiere sind nicht zur Verpaarung geeignet, da bei diesen eine hohe Zahl von Totgeburten auftritt, wohingegen Männliche CA II^{-/-}-Tiere zur Verpaarung verwendet werden können (Zhou, Clarke et al. 2001).

Nach der Durchführung von computergestützten Spermien Analysen zeigten sich Unterschiede in der Motilität von CA IV^{-/-}-Spermien im Vergleich zu CA IV^{+/+}-Spermien (Abbildung 18). Außer beim Vergleich des prozentualen Anteils motiler Spermien, welcher in CA IV^{-/-}-Tieren um 38% reduziert ist, wurde auch beim Vergleich der Menge schnell progressiver Spermien eine signifikante Reduktion um 43% beobachtet. Es wurde außerdem eine Reduktion des Anteils langsam progressiver Spermien sowie der durchschnittlichen Geschwindigkeit (µm/s) von CA IV^{-/-}-Spermien festgestellt, welche sich jedoch als nicht signifikant herausstellten. Somit wurde gezeigt, dass ein knock out der CA IV die Entwicklung motiler, progressiver Spermien beeinträchtigt. Aufgrund dieser Beobachtungen lassen sich allerdings keine Aussagen über die enzymatische Aktivität der CA IV in Spermien bzw. deren Einfluss auf die Bikarbonat-induzierte Erhöhung der Schlagfrequenz treffen. Daher wurde zunächst untersucht, welchen Anteil die CA IV an der Gesamtcarboanhydraseaktivität übernimmt, indem die enzymatische Aktivität

von CA IV^{-/-}-Spermien mit der von CA IV^{+/+}-Spermien verglichen wurde (Abbildung 19). Hierbei wurde für CA IV^{-/-}-Spermien im Vergleich zu CA IV^{+/+}-Spermien eine Reduktion der enzymatischen Aktivität um 32% beobachtet. Daher übernimmt die CA IV etwa ein Drittel der Gesamtcarboanhydraseaktivität in murinen Spermien. Es ist jedoch auch denkbar, dass es in CA IV^{-/-}-Spermien zur kompensatorischen Überexpression anderer CA-Isoformen kommt, welche die Funktion der CA IV übernehmen könnten. Somit wäre möglich, dass die CA IV weit mehr als 32% der Gesamtcarboanhydraseaktivität in Spermien übernimmt. Um zu überprüfen, inwiefern die Aktivität der CA IV in die Erhöhung der Schlagfrequenz involviert ist, wurde in einem weiteren Experiment die Reaktion von CA IV^{-/-}-Spermien und CA IV^{+/+}-Spermien auf die Stimulation mit Bikarbonat (Abbildung 20B), bzw. CO₂ (Abbildung 21B) untersucht. Um einen Anhaltspunkt über die Funktion anderer CA-Isoformen in Spermien zu erlangen, wurde das gleiche Experiment zudem mit CA II^{-/-}- (Abbildung 20A bzw. 21A) sowie CA XIV^{-/-}-Spermien (Abbildung 20C bzw. 21C) durchgeführt. Bei CA IV^{-/-}-Spermien wurde im Vergleich zu CA IV^{+/+}-Spermien nach Applikation von Bikarbonat kein signifikanter Unterschied bei der Erhöhung der Schlagfrequenz festgestellt. Sowohl die Frequenz von CA IV^{-/-}-Spermien als auch die Frequenz von CA IV^{+/+}-Spermien erreichte etwa 40 Sekunden nach Zugabe von HCO₃⁻ einen maximalen Wert. Im Gegensatz dazu benötigten CA II^{-/-}-Spermien 20 Sekunden länger um ihre Schlagfrequenz auf einen vergleichbaren Wert zu erhöhen. Bei CA XIV^{-/-}-Spermien wurde erst 3

Minuten nach der Applikation von Bikarbonat ein maximaler Wert erreicht. An der Bikarbonat-vermittelten Aktivierung von Spermien scheint demnach die CA XIV beteiligt zu sein, während hierbei jedoch die CA IV nicht notwendig ist. Im Vergleich zur Bikarbonat-vermittelten Aktivierung der Schlagfrequenz wurde nach Stimulation mit CO₂ ein signifikanter Unterschied zwischen CA IV^{-/-}- und CA IV^{+/+}-Spermien beobachtet. Die Frequenzen aller gemessenen CA KO-Spermien erreichten hierbei auch nach längerer Stimulation mit CO₂ deutlich niedrigere Werte als CA IV^{+/+}-Spermien. Zudem wurde beobachtet, dass CA IV^{-/-}- und CA II^{-/-}-Spermien nach der Applikation von CO₂ etwa 40 Sekunden länger benötigen als CA IV^{+/+} und CA XIV^{-/-}-Spermien, um ihre Frequenz auf einen maximalen Wert zu erhöhen. CA XIV^{-/-} zeigten gegenüber CA IV^{+/+}-Spermien den geringsten Unterschied in der CO₂-vermittelten Erhöhung der Schlagfrequenz. Diese Ergebnisse vermitteln den Eindruck, dass die extrazelluläre CA IV an der CO₂-induzierten Erhöhung der Schlagfrequenz von Spermien beteiligt ist, während die ebenfalls extrazellulär lokalisierte CA XIV hierfür nicht benötigt wird. Die intrazelluläre CA II ist den Versuchsergebnissen zufolge in Spermien sowohl an der Aktivierung der Schlagfrequenz durch Bikarbonat als auch durch CO₂ beteiligt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beiden untersuchten extrazellulären CA-Isoformen (IV, XIV) bevorzugt in entgegengesetzte Richtung arbeiten. Ein weiteres Indiz hierfür lieferte eine intrazelluläre pH-Messung an CA IV^{-/-}-, CA XIV^{-/-}- sowie CA IV^{+/+}-Spermien. Hierbei wurde die intrazelluläre Ansäuerung der verschiedenen Spermien nach Zugabe von

CO₂ in Abhängigkeit der Zeit verglichen (Abbildung 22). In wt-Spermien wurde eine ΔpH_i -Wert-Änderung von -0,23, mit einem τ -Wert von $43,15 \pm 2,09$ s beobachtet. Ähnliche Werte lieferte die pH_i -Messung an CA XIV^{-/-}-Spermien. Hierbei wurde eine ΔpH_i -Wert-Änderung von -0,20 und ein τ -Wert von $46,47 \pm 1,94$ s ermittelt. Im Vergleich dazu zeigten CA IV^{-/-}-Spermien mit einem ΔpH_i von -0,27 und einem τ -Wert von $59,92 \pm 2,23$ s eine leicht stärkere sowie schnellere intrazelluläre Ansäuerung. Somit scheint bei CA IV^{-/-}-Spermien das Angebot an extrazellulärem CO₂ erhöht zu sein, da die intrazelluläre Ansäuerung aus der Diffusion von extrazellulärem CO₂ in die Zelle resultiert. Während die CA IV in anderen Geweben und Zelltypen, wie z.B. Niere und Lunge die Reaktion von Bikarbonat und Protonen zu CO₂ und H₂O katalysiert (Zhu and Sly 1990; Parkkila 2000; Breton 2001), vermitteln die Ergebnisse der intrazellulären pH-Messung den Eindruck, dass die CA IV in Spermien die umgekehrte Reaktion katalysiert. Dies lässt vermuten, dass die CA IV in Spermien für die Bereitstellung von extrazellulärem Bikarbonat verantwortlich ist. Bei CA IV^{-/-}-Spermien würde somit im Vergleich zu CA XIV^{+/+}-Spermien mehr extrazelluläres CO₂ zur Diffusion in die Zelle zur Verfügung stehen, wodurch die verstärkte intrazelluläre Ansäuerung zu erklären ist. Bei CA XIV^{-/-}-Spermien hingegen scheint das Angebot an extrazellulärem CO₂ im Vergleich zu wt-Spermien etwas geringer zu sein. Dies deutet daraufhin, dass CA XIV und CA IV in gegenläufige Richtung arbeiten. Dadurch würde extrazellulär stets für ein Gleichgewicht zwischen CO₂ und HCO₃⁻ gesorgt. Somit ist nicht auszuschließen, dass bei der

Aktivierung von Spermien ein Zusammenspiel von Bikarbonatimport und Diffusion von CO_2 über die Plasmamembran stattfindet (Abbildung 32). Dies würde zudem erklären, dass die intrazelluläre CA II auch bei der Bikarbonat-vermittelten Erhöhung der Schlagfrequenz benötigt wird, um intrazellulär HCO_3^- zur Aktivierung der SACY bereitzustellen. Wie bereits erwähnt, produziert diese demzufolge cAMP, welches über die Aktivierung der PKA zur Erhöhung der Schlagfrequenz führt.

Die Beobachtung, dass das cAMP-Analogon cBIMPS unabhängig von Bikarbonat die Erhöhung der Schlagfrequenz induziert (*Carlson, Hille et al. 2007*), konnte in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden (Abbildung 23). Nach Stimulation von Spermien mit 50 μM cBIMPS beschleunigten diese innerhalb von 10 Minuten ihre Frequenz von $2,77 \pm 0,16$ Hz auf einen maximalen Wert von $5,24 \pm 0,29$ Hz. Um zu überprüfen, ob Carboanhydrasen in der Signalkaskade stromauf- oder stromabwärts von cAMP agieren, wurden Spermien sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von EZA mit cBIMPS stimuliert (Abbildung 24). Daraufhin beschleunigten EZA behandelte Spermien ihre Schlagfrequenz von $2,24 \pm 0,11$ Hz auf $5,12 \pm 0,35$ Hz, unbehandelte Spermien von $2,32 \pm 0,10$ Hz auf $4,71 \pm 0,52$ Hz. Durch Inhibition von CA konnte demnach kein Unterschied in der Reaktion auf cBIMPS beobachtet werden, was bedeutet, dass die cBIMPS-induzierte Aktivierung der Schlagfrequenz nicht von der Aktivität von Carboanhydrasen abhängig ist (Abbildung 33).

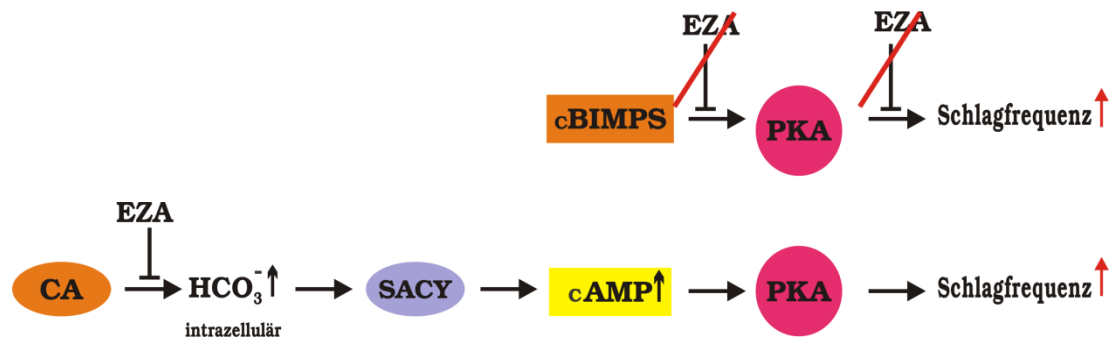


Abbildung 33: Das cAMP-Analogon cBIMPS induziert in Spermien die Erhöhung der Schlagfrequenz auch bei Zugabe des CA-Inhibitors EZA. Somit ist die Aktivität von Carboanhydrasen der cAMP-induzierten Aktivierung der PKA vorgeschaltet.

In einem weiteren Experiment wurde derselbe Sachverhalt nochmals in Bezug auf die CA IV überprüft, indem sowohl wt-Spermien als auch CA IV^{-/-}-Spermien mit cBIMPS stimuliert wurden (Abbildung 23). Parallel dazu wurde als Kontrolle mit CO₂ stimuliert, wobei die Schlagfrequenz von CA IV^{-/-}-Spermien im Vergleich zu der von wt-Spermien einen 20% geringeren Wert erreichte. Nach Applikation von cBIMPS erhöhten CA IV^{-/-}-Spermien ihre Frequenz auf 5,83±0,30 Hz und CA IV^{+/+}-Spermien auf 5,71±0,24 Hz. Somit konnte kein Unterschied in der Beschleunigung der Schlagfrequenz von CA IV^{-/-}-Spermien gegenüber CA IV^{+/+}-Spermien festgestellt werden. Die CA IV sowie andere CA sind daher nicht an der Aktivierung der Schlagfrequenz durch cBIMPS beteiligt. Die Aktivität von Carboanhydrasen muß somit der cAMP-induzierten Aktivierung der PKA vorgeschaltet sein (Abbildung 33).

Es wurde zuvor bereits gezeigt, dass die Schlagfrequenz durch Diffusion von CO₂ in die Spermienzelle erhöht wird. Weiterhin ist jedoch unklar, ob zusätzlich auch der Import von Bikarbonat durch Transportproteine bei der

Erhöhung der Schlagfrequenz eine Rolle spielt. Daher sollte in dieser Arbeit mit Hilfe einer intrazellulären pH-Messung an Spermien der Transport von Bikarbonat in die Zelle untersucht werden. Hierzu wurde durch Stimulation mit CO_2 wiederum eine intrazelluläre Ansäuerung induziert (Abbildung 26). Parallel dazu wurden Spermien sowohl mit CO_2 als auch mit HCO_3^- behandelt. In Abwesenheit von HCO_3^- betrug die Verringerung des intrazellulären pH-Werts 0,92, während durch simultane Applikation von CO_2 und HCO_3^- lediglich eine intrazelluläre Ansäuerung um 0,41 pH-Einheiten beobachtet wurde. Somit werden Protonen, welche nach Diffusion von CO_2 in der Zelle durch Carboanhydrasen gebildet werden, durch die simultane Applikation von Bikarbonat abgepuffert. Dies ist lediglich durch einen Import von HCO_3^- zu erklären, wobei unklar ist, welches Transportprotein hierfür verantwortlich ist. Es wurde allerdings bereits beobachtet, dass in murinen Spermien $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Ko-Transporter in die Kapazitation involviert sind (Visconti, Westbrook et al. 2002). Außerdem gelang es einer weiteren Arbeitsgruppe, die Anwesenheit von NBC in Spermien der Ratte nachzuweisen (Jensen, Schmitt et al. 1999). Daher wurde in dieser Arbeit mit Hilfe eines Anti-NBC1-Antikörpers die Anwesenheit von NBC1 in murinen Spermien sowohl mit Hilfe von Western-Blot Analysen (Abbildung 27) als auch mittels Immunzytologie (Abbildung 28) überprüft. Durch Western-Blot Analyse wurde im Proteinextrakt von Spermien ein NBC1-Signal bei einer Größe von etwa 160 kDa detektiert, welches der Größe des NBC-Signals in Spermien der Ratte entspricht (Jensen, Schmitt et al. 1999). Mit Hilfe der

Immunzytologie konnte NBC1 in Spermien ebenfalls nachgewiesen werden. Hierbei wurde beobachtet, dass NBC1 sowohl im Akrosom als auch im Hauptstück des Spermischwanzes lokalisiert ist. Da in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt wurde, dass auch die extrazelluläre CA IV in diesem Bereich lokalisiert ist (Wandernoth, Raubuch et al. 2010), deutet darauf hin, dass NBC1 im Bereich des Hauptstücks des Spermischwanzes zur Erhöhung der Schlagfrequenz den Import von Bikarbonat-Ionen übernimmt. Hierbei ist allerdings nicht auszuschließen, dass noch weitere Anionentransporter in diesen Prozess involviert sind.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Spermien ein Import von extrazellulärem Bikarbonat stattfindet. Desweiteren wurde mit der Anwesenheit von NBC1 in Spermien ein möglicher Kandidat identifiziert, der in diesen Mechanismus involviert sein könnte. Um nun zu überprüfen, ob der Import von Bikarbonat durch Anionentransporter an der Erhöhung der Schlagfrequenz von Spermien beteiligt sind, wurden diese vor der Stimulation durch HCO_3^- mit dem Anionentransport-Inhibitor DIDS behandelt. Nach Applikation von HCO_3^- wurde in Anwesenheit verschiedener DIDS Konzentrationen ein Dosis-abhängiger Effekt auf die Beschleunigung der Schlagfrequenz beobachtet (Abbildung 29). Im Vergleich zu unbehandelten Spermien, welche ihre Schlagfrequenz nach Stimulation auf $7,56 \pm 0,34$ Hz beschleunigten, konnte durch Vorbehandlung mit $100 \mu\text{M}$ DIDS lediglich ein Wert von $5,44 \pm 0,27$ Hz erreicht werden, was einer Reduktion um 28%

entspricht. In einem weiteren Experiment wurde der Effekt von DIDS auf den Import von Bikarbonat mit Hilfe einer intrazellulären pH-Messung untersucht (Abbildung 30). Nach CO₂-induzierter intrazellulärer Ansäuerung folgte die Applikation von Bikarbonat, was zu einer intrazellulären Alkalinisierung um 0,39 pH-Einheiten führte. Im Vergleich dazu wurde nach gleichzeitiger Applikation von Bikarbonat und DIDS ein ΔpH_i von 0,13 beobachtet. Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass in murinen Spermien ein Import von Bikarbonat-Ionen durch Anionentransporter stattfindet, welcher in die Erhöhung der Schlagfrequenz involviert ist. Um zu überprüfen, ob NBC1 oder andere Na⁺/HCO₃⁻-Ko-Transporter hierfür verantwortlich sind, wurde mit einer weiteren intrazellulären pH-Messungen untersucht, ob der Import von Bikarbonat in Spermien Natrium-abhängig ist. Hierzu erfolgte wiederum nach der CO₂-bedingten Erniedrigung des pH_i die Applikation von HCO₃⁻. Die Messung wurde sowohl in normalem Puffer als auch in Natrium-freiem Puffer durchgeführt (Abbildung 31), wobei kein wesentlicher Unterschied bei der intrazellulären Ansäuerung festgestellt wurde. Bei der anschließenden intrazellulären Alkalinisierung durch Applikation von Bikarbonat wurde in Anwesenheit von Natrium ein ΔpH_i von 0,29 beobachtet, während in Abwesenheit von Natrium eine etwas geringere pH_i-Änderung von 0,21 ermittelt wurde. Dies deutet darauf hin, dass Na⁺/HCO₃⁻-Ko-Transporter am Bikarbonat-Import in Spermien beteiligt sind.

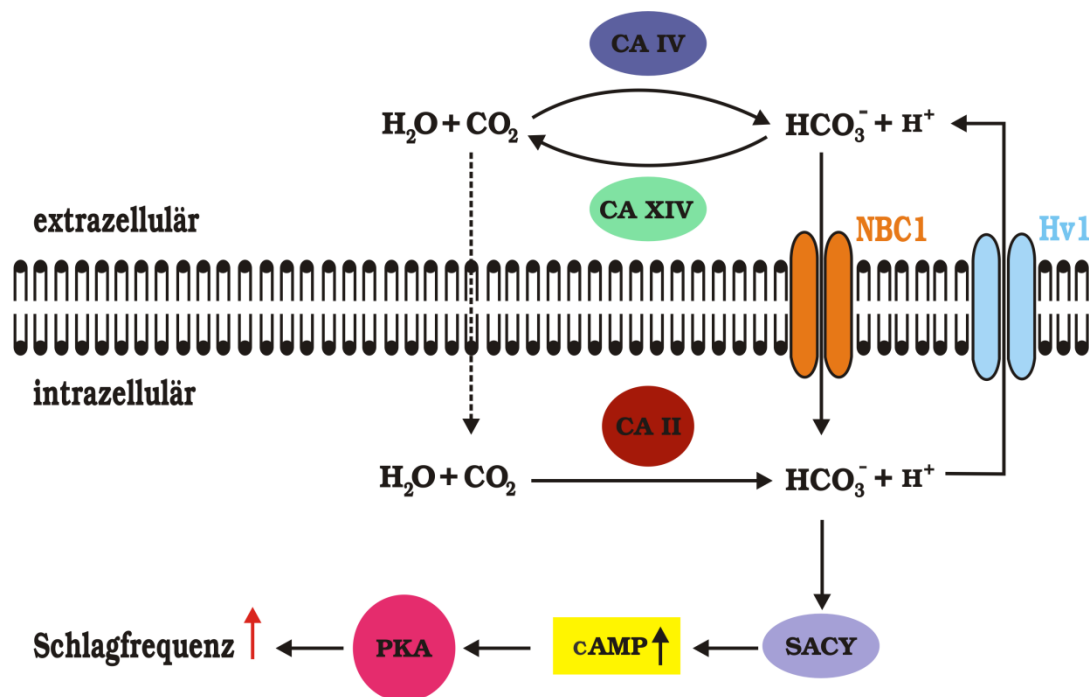


Abbildung 34: Aufgrund der gegenläufig arbeitenden extrazellulären CA-Isoformen IV und XIV findet bei der frühen Aktivierung von Spermien ein Zusammenspiel von Bikarbonatimport und Diffusion von CO_2 über die Plasmamembran statt. CO_2 wird durch die intrazellulär lokalisierte CA II zu HCO_3^- und Protonen umgewandelt, welche über Hv1 aus der Zelle transportiert werden. Im Zytoplasma aktiviert HCO_3^- die spermien-spezifische Adenylatzyklase (SACY) und induziert somit den Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Dies führt zur Aktivierung der PKA und somit zur Phosphorylierung von Zielproteinen wodurch die Schlagfrequenz erhöht wird.

Da die intrazelluläre Alkalinisierung durch Entzug von Natrium allerdings nur leicht gehemmt wird, deutet dies auf die Anwesenheit weiterer Anionentransporter hin, welche unabhängig von Natrium arbeiten.

5 Zusammenfassung:

Während der Speicherung im Nebenhoden verharren reife Spermien in einem immotilen Stadium. Erst die erhöhte Bikarbonatkonzentration im Seminalplasma induziert die Aktivitätssteigerung der Spermien. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese, als frühe Aktivierung von Spermien bezeichnete Erhöhung der Schlagfrequenz sowohl durch Bikarbonat als auch durch CO_2 induziert werden kann. Die reversible Reaktion von Bikarbonat und Protonen zu CO_2 und H_2O wird in vielen unterschiedlichen Geweben und Zelltypen von Carboanhydrasen katalysiert. Mithilfe massenspektrometrischer Messungen konnte die enzymatische Aktivität der CA IV in Spermien nachgewiesen werden. Bei Schlagfrequenzanalysen zeigte sich zudem, dass Carboanhydrasen sowohl an der Bikarbonat- als auch an der CO_2 -vermittelten Erhöhung der Schlagfrequenz muriner Spermien beteiligt sind. Weitere Analysen mit Spermien von verschiedenen CA KO-Mäusen zeigten, dass die extrazelluläre CA IV in die CO_2 -induzierte Erhöhung der Schlagfrequenz involviert ist, während die extrazelluläre CA XIV bei der Bikarbonat-induzierten Frequenzerhöhung beteiligt ist. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die extrazelluläre CA IV sowie die extrazelluläre CA XIV in gegenläufige Richtung arbeiten, wodurch in unmittelbarer Umgebung der Spermien ein Gleichgewicht zwischen CO_2 und HCO_3^- entsteht. Somit findet bei der frühen Aktivierung eine Kombination aus Bikarbonat-Import und Diffusion von CO_2

über die Plasmamembran statt. Die intrazelluläre CA II katalysiert hierbei im Zytosol die Umsetzung von CO_2 zu HCO_3^- und Protonen. Für den Import von Bikarbonat sind verschiedene Anionentransporter zuständig. Unter diesen spielen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Ko-Transporter wie z.B. NBC1, welcher in dieser Arbeit in murinen Spermien lokalisiert wurde, eine eher untergeordnete Rolle, da intrazelluläre pH-Messungen zeigten, dass der Bikarbonatimport hauptsächlich von Natrium-unabhängigen Anionentransportern übernommen wird. Im Zytoplasma induziert Bikarbonat durch Aktivierung der SACY die Erhöhung der Schlagfrequenz. Die Aktivität von Carboanhydrasen konnte in dieser Signalkaskade vor der Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration eingeordnet werden, da gezeigt wurde das Carboanhydrasen nach Aktivierung der SACY für die Beschleunigung der Schlagfrequenz nicht benötigt werden.

6 Literaturverzeichnis:

1. Abuladze, N., I. Lee, et al. (1998). "Axial heterogeneity of sodium-bicarbonate cotransporter expression in the rabbit proximal tubule." *Am J Physiol* 274(3 Pt 2): F628-633.
2. Allison, A. C. and E. F. Hartree (1970). "Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization." *J Reprod Fertil* 21(3): 501-515.
3. Alvarez, B. V., F. B. Loisele, et al. (2003). "Direct extracellular interaction between carbonic anhydrase IV and the human NBC1 sodium/bicarbonate co-transporter." *Biochemistry* 42(42): 12321-12329.
4. Asari, M., K. Sasaki, et al. (1996). "Immunohistolocalization of the carbonic anhydrase isoenzymes (CA-I, CA-II, and CA-III) in the reproductive tract of male horses." *Am J Vet Res* 57(4): 439-443.
5. Au, C. L. and P. Y. Wong (1980). "Luminal acidification by the perfused rat cauda epididymidis." *J Physiol* 309: 419-427.
6. Austin, C. R. (1951). "Observations of the penetration of sperm into the mammalian egg." *Australian Journal of Scientific Research* 4: 581-596.
7. Badger, M. R. and G. D. Price (1989). "Carbonic Anhydrase Activity Associated with the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942." *Plant Physiol* 89(1): 51-60.
8. Bagnis, C., M. Marsolais, et al. (2001). "Na⁺/H⁺-exchange activity and immunolocalization of NHE3 in rat epididymis." *Am J Physiol Renal Physiol* 280(3): F426-436.
9. Bevensee, M. O., B. M. Schmitt, et al. (2000). "An electrogenic Na⁽⁺⁾-HCO⁽⁻⁾(3) cotransporter (NBC) with a novel COOH-terminus, cloned from rat brain." *Am J Physiol Cell Physiol* 278(6): C1200-1211.

10. Blank, M. E. and H. Ehmke (2003). "Aquaporin-1 and HCO₃⁻-Cl⁻ transporter-mediated transport of CO₂ across the human erythrocyte membrane." *J Physiol* 550(Pt 2): 419-429.
11. Boron, V. F., M. A. Hediger, et al. (1997). "The renal electrogenic Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter." *J Exp Biol* 200(Pt 2): 263-268.
12. Boron, W. F., P. Fong, et al. (1997). "The electrogenic Na/HCO₃ cotransporter." *Wien Klin Wochenschr* 109(12-13): 445-456.
13. Breton, S. (2001). "The cellular physiology of carbonic anhydrases." *JOP* 2(4 Suppl): 159-164.
14. Breton, S., P. J. Smith, et al. (1996). "Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase." *Nat Med* 2(4): 470-472.
15. Brooks, D. E. (1983). "Epididymal functions and their hormonal regulation." *Aust J Biol Sci* 36: 205-221.
16. Burnham, C. E., H. Amlal, et al. (1997). "Cloning and functional expression of a human kidney Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter." *J Biol Chem* 272(31): 19111-19114.
17. Carlson, A. E., B. Hille, et al. (2007). "External Ca²⁺ acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility." *Dev Biol* 312(1): 183-192.
18. Carlson, A. E., R. E. Westenbroek, et al. (2003). "CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 14864-14868.
19. Carr, D. W., M. C. Usselman, et al. (1985). "Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison." *Biol Reprod* 33(3): 588-595.
20. Chang, M. C. (1951). "Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes." *Nature* 168: 697-698.

21. Chen, Y., M. J. Cann, et al. (2000). "Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor." *Science* 289(5479): 625-628.
22. Cordat, E. and J. R. Casey (2009). "Bicarbonate transport in cell physiology and disease." *Biochem J* 417(2): 423-439.
23. Demarco, I. A., F. Espinosa, et al. (2003). "Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation." *J Biol Chem* 278(9): 7001-7009.
24. Ekstedt, E., L. Holm, et al. (2004). "Carbonic anhydrase in mouse testis and epididymis; transfer of isozyme IV to spermatozoa during passage." *J Mol Histol* 35(2): 167-173.
25. Ekstedt, E. and Y. Ridderstrale (1992). "Histochemical localization of carbonic anhydrase in the testis and epididymis of the rabbit." *Acta Anat (Basel)* 143(3): 258-264.
26. Esposito, G., B. S. Jaiswal, et al. (2004). "Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 2993-2998.
27. Evans, J. P. and H. M. Florman (2002). "The state of the union: the cell biology of fertilization." *Nat Cell Biol* 4 Suppl: s57-63.
28. Ficarro, S., O. Chertihin, et al. (2003). "Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation." *J Biol Chem* 278(13): 11579-11589.
29. Fleming, R. E., S. Parkkila, et al. (1995). "Carbonic anhydrase IV expression in rat and human gastrointestinal tract regional, cellular, and subcellular localization." *J Clin Invest* 96(6): 2907-2913.
30. Flesch, F. M., E. Wijnand, et al. (2001). "Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida." *Mol Reprod Dev* 60(1): 107-115.

31. Fujikawa-Adachi, K., I. Nishimori, et al. (1999). "Human carbonic anhydrase XIV (CA14): cDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosome 1." *Genomics* 61(1): 74-81.
32. Gadella, B. M. and R. A. Harrison (2000). "The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane." *Development* 127(11): 2407-2420.
33. Ghandour, M. S., O. K. Langley, et al. (1992). "Carbonic anhydrase IV on brain capillary endothelial cells: a marker associated with the blood-brain barrier." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15): 6823-6827.
34. Gross, E., K. Hawkins, et al. (2001). "The stoichiometry of the electrogenic sodium bicarbonate cotransporter NBC1 is cell-type dependent." *J Physiol* 531(Pt 3): 597-603.
35. Gross, E., K. Hawkins, et al. (2001). "Phosphorylation of Ser(982) in the sodium bicarbonate cotransporter kNBC1 shifts the HCO_3^- : Na^+ stoichiometry from 3 : 1 to 2 : 1 in murine proximal tubule cells." *J Physiol* 537(Pt 3): 659-665.
36. Gross, E. and I. Kurtz (2002). "Structural determinants and significance of regulation of electrogenic Na^+ - HCO_3^- cotransporter stoichiometry." *Am J Physiol Renal Physiol* 283(5): F876-887.
37. Harrison, D. A., D. W. Carr, et al. (2000). "Involvement of protein kinase A and A kinase anchoring protein in the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction." *Biol Reprod* 62(3): 811-820.
38. Harrison, R. A. (2004). "Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate." *Mol Reprod Dev* 67(3): 337-352.
39. Harrison, R. A. and N. G. Miller (2000). "cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm." *Mol Reprod Dev* 55(2): 220-228.

40. Holstein, A. F., W. Schulze, et al. (2003). "Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment." *Reprod Biol Endocrinol* 1: 107.
41. Jaiswal, B. S. and M. Conti (2001). "Identification and functional analysis of splice variants of the germ cell soluble adenylyl cyclase." *J Biol Chem* 276(34): 31698-31708.
42. Jensen, L. J., B. M. Schmitt, et al. (1999). "Localization of sodium bicarbonate cotransporter (NBC) protein and messenger ribonucleic acid in rat epididymis." *Biol Reprod* 60(3): 573-579.
43. Jungnickel, M. K., K. A. Sutton, et al. (2007). "Phosphoinositide-dependent pathways in mouse sperm are regulated by egg ZP3 and drive the acrosome reaction." *Dev Biol* 304(1): 116-126.
44. Junqueira L. C., C. J., Ed. (2004). *Histologie Heidelberg*, Springer Medizin Verlag.
45. Kadoya, Y., H. Kuwahara, et al. (1987). "Isolation of a novel carbonic anhydrase from human saliva and immunohistochemical demonstration of its related isozymes in salivary gland." *Osaka City Med J* 33(1): 99-109.
46. Kaunisto, K., S. Parkkila, et al. (1995). "Expression of carbonic anhydrase isoenzymes IV and II in rat epididymal duct." *Biol Reprod* 52(6): 1350-1357.
47. Kumpulainen, T. (1979). "Immunohistochemical localization of human carbonic anhydrase isoenzyme C." *Histochemistry* 62(3): 271-280.
48. Levine, N. and H. Kelly (1978). "Measurement of pH in the rat epididymis in vivo." *J Reprod Fertil* 52(2): 333-335.
49. Levine, N. and D. J. Marsh (1971). "Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats." *J Physiol* 213(3): 557-570.

50. Lishko, P. V. and Y. Kirichok (2010). "The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation." *J Physiol* 588(Pt 23): 4667-4672.
51. Lishko, P. V. and Y. Kirichok (2010). "The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation." *J Physiol*.
52. Litvin, T. N., M. Kamenetsky, et al. (2003). "Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate." *J Biol Chem* 278(18): 15922-15926.
53. Martin, R. H. (2008). "Cytogenetic determinants of male fertility." *Hum Reprod Update* 14(4): 379-390.
54. Mezquita, P., C. Mezquita, et al. (1999). "Novel transcripts of carbonic anhydrase II in mouse and human testis." *Mol Hum Reprod* 5(3): 199-205.
55. Mori, K., Y. Ogawa, et al. (1999). "Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney." *J Biol Chem* 274(22): 15701-15705.
56. Nolan, M. A., D. F. Babcock, et al. (2004). "Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(37): 13483-13488.
57. Okamura, N., Y. Tajima, et al. (1985). "Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase." *J Biol Chem* 260(17): 9699-9705.
58. Parkkila, S. (2000). "An overview of the distribution and function of carbonic anhydrase in mammals." *EXS*(90): 79-93.
59. Parkkila, S., K. Kaunisto, et al. (1991). "A high activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II) is present in mammalian spermatozoa." *Histochemistry* 95(5): 477-482.
60. Parkkila, S., K. Kaunisto, et al. (1990). "Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human

- parotid and submandibular glands." *J Histochem Cytochem* 38(7): 941-947.
61. Parkkila, S., A. K. Parkkila, et al. (2000). "Expression of the membrane-associated carbonic anhydrase isozyme XII in the human kidney and renal tumors." *J Histochem Cytochem* 48(12): 1601-1608.
62. Rebello, G., R. Ramesar, et al. (2004). "Apoptosis-inducing signal sequence mutation in carbonic anhydrase IV identified in patients with the RP17 form of retinitis pigmentosa." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(17): 6617-6622.
63. Rink, T. J., R. Y. Tsien, et al. (1982). "Cytoplasmic pH and free Mg^{2+} in lymphocytes." *J Cell Biol* 95(1): 189-196.
64. Romero, M. F. and W. F. Boron (1999). "Electrogenic Na^+/HCO_3^- cotransporters: cloning and physiology." *Annu Rev Physiol* 61: 699-723.
65. Romero, M. F., M. A. Hediger, et al. (1997). "Expression cloning and characterization of a renal electrogenic Na^+/HCO_3^- cotransporter." *Nature* 387(6631): 409-413.
66. Shah, G. N., B. Ulmasov, et al. (2005). "Carbonic anhydrase IV and XIV knockout mice: roles of the respective carbonic anhydrases in buffering the extracellular space in brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(46): 16771-16776.
67. Shum, W. W., N. Da Silva, et al. (2009). "Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk." *J Exp Biol* 212(Pt 11): 1753-1761.
68. Sinclair, M. L., X. Y. Wang, et al. (2000). "Specific expression of soluble adenylyl cyclase in male germ cells." *Mol Reprod Dev* 56(1): 6-11.
69. Spicer, S. S., M. A. Sens, et al. (1982). "Immunocytochemical demonstration of carbonic anhydrase in human epithelial cells." *J Histochem Cytochem* 30(9): 864-873.

70. Suarez, S. S. and H. C. Ho (2003). "Hyperactivated motility in sperm." *Reprod Domest Anim* 38(2): 119-124.
71. Sun, X. C. and J. A. Bonanno (2003). "Identification and cloning of the Na/HCO₃⁻ cotransporter (NBC) in human corneal endothelium." *Exp Eye Res* 77(3): 287-295.
72. Supuran, C. T. (2008). "Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators." *Nat Rev Drug Discov* 7(2): 168-181.
73. Svichar, N., A. Waheed, et al. (2009). "Carbonic anhydrases CA4 and CA14 both enhance AE3-mediated Cl⁻-HCO₃⁻ exchange in hippocampal neurons." *J Neurosci* 29(10): 3252-3258.
74. Thomas, J. A., R. N. Buchsbaum, et al. (1979). "Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ." *Biochemistry* 18(11): 2210-2218.
75. Tulsiani, D. R., H. Yoshida-Komiya, et al. (1997). "Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event." *Biol Reprod* 57(3): 487-494.
76. Visconti, P. E., J. L. Bailey, et al. (1995). "Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation." *Development* 121(4): 1129-1137.
77. Visconti, P. E., X. Ning, et al. (1999). "Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation." *Dev Biol* 214(2): 429-443.
78. Visconti, P. E., J. Stewart-Savage, et al. (1999). "Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm." *Biol Reprod* 61(1): 76-84.

79. Visconti, P. E., V. A. Westbrook, et al. (2002). "Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity." *J Reprod Immunol* 53(1-2): 133-150.
80. Vredenburg-Wilberg, W. L. and J. J. Parrish (1995). "Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation." *Mol Reprod Dev* 40(4): 490-502.
81. Waheed, A., X. L. Zhu, et al. (1992). "Rat skeletal muscle membrane associated carbonic anhydrase is 39-kDa, glycosylated, GPI-anchored CA IV." *Arch Biochem Biophys* 294(2): 550-556.
82. Wandernoth, P. M., M. Raubuch, et al. (2010). "Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm." *PLoS One* 5(11): e15061.
83. Ward, C. R., G. S. Kopf, et al. (1994). "Solubilization and partial purification from mouse sperm membranes of the specific binding activity for 3-quinuclidinyl benzilate, a potent inhibitor of the zona pellucida-induced acrosome reaction." *Mol Reprod Dev* 39(4): 423-432.
84. Ward, C. R., B. T. Storey, et al. (1992). "Activation of a Gi protein in mouse sperm membranes by solubilized proteins of the zona pellucida, the egg's extracellular matrix." *J Biol Chem* 267(20): 14061-14067.
85. Wennemuth, G., D. F. Babcock, et al. (2003). "Calcium clearance mechanisms of mouse sperm." *J Gen Physiol* 122(1): 115-128.
86. Wennemuth, G., A. E. Carlson, et al. (2003). "Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺-channel responses: initial events in sperm activation." *Development* 130(7): 1317-1326.
87. Wennemuth, G., R. E. Westenbroek, et al. (2000). "CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca²⁺ channels in depolarization-evoked entry of Ca²⁺ into mouse sperm." *J Biol Chem* 275(28): 21210-21217.

88. Wistrand, P. J., N. D. Carter, et al. (1999). "Carbonic anhydrase IV activity is localized on the exterior surface of human erythrocytes." *Acta Physiol Scand* 165(2): 211-218.
89. Zhou, Q., L. Clarke, et al. (2001). "Estrogen action and male fertility: roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproductive tract function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 14132-14137.
90. Zhu, X. L. and W. S. Sly (1990). "Carbonic anhydrase IV from human lung. Purification, characterization, and comparison with membrane carbonic anhydrase from human kidney." *J Biol Chem* 265(15): 8795-8801.

7 Publikationen/Danksagung:

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

PLoS One. 2010 Nov 24;5(11):e15061

Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm.

Wandernoth PM, Raubuch M, Mannowetz N, Becker HM, Deitmer JW, Sly WS, Wennemuth G.

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz herzlich bedanken bei.....

- meinem Doktorvater Prof. Dr. Gunther Wennemuth, für die freundliche und unkomplizierte Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die kompetente Betreuung meiner Doktorarbeit, sowie für Geduld und Hinweise bei der Anfertigung der Dissertation.
- Herr Prof. Dr. Joachim W. Deitmer und Jun.Prof. Dr. Holger M. Becker aus der Abteilung für allgemeine Zoologie, der Technischen Universität Kaiserslautern, für die problemlose Unterstützung und aufgebrauchte Zeit bei der Durchführung der massenspektrometrischen Messungen.
- Herr Prof. Dr. Markus Hoth, der sich freundlicherweise bereit erklärte, die Zweitkorrektur meiner Dissertation zu übernehmen.
- Frau Dr. Nadja Mannowetz und Frau Ingrid Lang für alle sachkundigen Ratschläge bei anfallenden Problemen des Laboralltags.
- der gesamten AG Wennemuth für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen lustigen Stunden.
- All meinen Freunden für die von Zeit zu Zeit benötigte Ablenkung.
- meinen Eltern, die mich immer finanziell und emotional unterstützten und meiner ganzen Familie, die mir die nötige Ruhe schenkte.

DANKE!